



АВТОСЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗБЫТОЧНОГО АКТИВНОГО ИЛА, ИСПОЛЬЗОВАННОГО В КАЧЕСТВЕ ИНОКУЛЯТА ПРИ ТЕМНОВОМ ПОЛУЧЕНИИ БИОВОДОРОДА ИЗ СУБСТРАТОВ С РАЗНЫМ БИОПОЛИМЕРНЫМ СОСТАВОМ

**Ю.В. Литти¹, Д.А. Ковалев², А.А. Ковалев², А.Ю. Меркель¹,
А.В. Вишнякова¹, Ю.И. Русскова¹, А.Н. Ножевникова¹**

¹ФИЦ Биотехнологии РАН
119071, РФ, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
тел. +7(926)369-92-43, e-mail: litty-yuriy@mail.ru

²ФГБНУ ФНАЦ ВИМ
109428, РФ, г. Москва, 1-й Институтский проезд, дом 5

doi: 10.15518/isjaee.2020.10.007

Заключение совета рецензентов: 23.09.20

Заключение совета экспертов: 23.09.20

Принято к публикации: 29.09.20

При использовании смешанных органических отходов в микробном сообществе реактора темновой ферментации происходит автоселекция микроорганизмов, наиболее приспособленных к данному биополимерному составу субстрата. В этом исследовании были использованы 6 субстратов, моделирующих разные биополимеры (белки, жиры, углеводы) и их смеси, для обогащения адаптированных к данным субстратам водород-продуцирующих бактерий из необработанного активного ила. С помощью высокопроизводительного секвенирования показано, что независимо от использованного субстрата, в микробном сообществе доминировал филум *Firmicutes* (67-100%). При использовании субстратов, богатых углеводами, микробное разнообразие было низким и в основном представлено родами *Ruminococcus* (26-90%) и *Thermoanaerobacterium* (6-67%). Темновая ферментация жиров и белков характеризовалась большим микробным разнообразием. При использовании жиров в наибольшей степени развивались *Thermoanaerobacterium* (21%), *Thermobrachium* (19%), *Tepidiphilus* (16%) и *Acetomicrobium* (14%), при использовании белков – *Thermobrachium* (34%), *Acetomicrobium* (16%) и *Clostridium sensu stricto* 7 (12%). Различные микробные сообщества и субстраты приводили к различиям в характеристиках процесса и метаболических путях. Максимальным был выход водорода из крахмала и составил 138 мл/г органического вещества с 60,4 % содержанием водорода в биогазе. Доминирование рода *Ruminococcus*, предположительно, внесло основной вклад в производство водорода. Согласно анализу стабильных изотопов ¹³C небольшие количества метана при темновой ферментации белков и жиров были образованы *Methanothermobacter* и *Methanosarcina* преимущественно водородотрофному типу метаногенеза.

Ключевые слова: темновая ферментация, биоводород, биополимеры, микробное разнообразие, высокопроизводительное секвенирование.



AUTO SELECTION OF MICROORGANISMS OF EXCESS ACTIVATED SLUDGE USED AS AN INOCULUM FOR FERMENTATIVE HYDROGEN PRODUCTION FROM SUBSTRATES WITH DIFFERENT BIOPOLYMERIC COMPOSITION

*Yu.V. Litti¹, D.A. Kovalev², A.A. Kovalev², A.Yu. Merkel¹,
A.V. Vishnyakova¹, Yu.I. Russkova¹, A.N. Nozhevnikova¹*

¹Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences»
119071, Russian Federation, Moscow, Leninsky prospect, 33, building 2
tel. +7 (926) 369-92-43, e-mail: litty-yuriy@mail.ru

²Federal Government Budgetary Institution of Science
"Federal scientific agroengineering centre VIM"

109428, Russian Federation, Moscow, 1st Institutskiy proezd, building 5

doi: 10.15518/isjaee.2020.10.007

Referred: 23.09.20

Received in revised form: 23.09.20

Accepted: 29.09.20

When mixed organic waste is used for hydrogen production by dark fermentation, the microbial community which is most adapted to actual biopolymer composition of the substrate, is auto-selected. In this research, 6 substrates simulating different biopolymers (proteins, fats, carbohydrates) and their mixtures were used to enrich hydrogen-producing bacteria adapted to these substrates from non-pretreated activated sludge. Phylum *Firmicutes* dominated in the microbial community (67-100%) regardless of the substrate used, as was shown by high-throughput sequencing. Microbial diversity was low when using carbohydrate-rich substrates, and microbial community was mainly represented by *Ruminococcus* (26-90%) and *Thermoanaerobacterium* (6-67%). Dark fermentation of fats and proteins was characterized by higher microbial diversity. *Thermoanaerobacterium* (21%), *Thermobrachium* (19%), *Tepidiphilus* (16%) and *Acetomicrobium* (14%) dominated when using fats, while *Thermobrachium* (34%), *Acetomicrobium* (16%) and *Clostridium sensu stricto* 7 (12%) dominated when using proteins as substrate. Different microbial communities and substrates resulted in diverse process performance and metabolic pathway. Dark fermentation of starch achieved the maximum hydrogen yield of 138 ml/g volatile solids with 60.4 % hydrogen content in biogas. The dominance of genus *Ruminococcus* was supposed to be responsible for the highest hydrogen production. Minor amounts of methane from proteins and fats were produced by *Methanothermobacter* and *Methanosarcina*. The hydrogenotrophic pathway was slightly more predominant methane formation route than the others considered based upon to the stable ¹³C isotope analysis.

Keywords: dark fermentation, biohydrogen, biopolymers, microbial diversity, high throughput sequencing.



*Литти Юрий
Владимирович
Yuriy V. Litti*

Сведения об авторе: ФИЦ Биотехнологии РАН, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания, кандидат биологических наук.

Образование: Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева (РХТУ) 2008г., инженер.

Область научных интересов: анаэробные микроорганизмы, метаногенные сообщества микроорганизмов, метаногенез, твердые органические отходы, очистка сточных вод, нитрификация, денитрификация, процесс анаммокс, анаммокс-бактерии.

Публикации: 29.

Индекс Хирша: РИНЦ - 7;

Scopus - 6; **WoS** - 5

SPIN: 1487-7611

Researcher ID: C-4945-2014

Information about the author: Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthropogenic Habitats, Candidate of Biological Sciences.

Education: D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (MUCTR) 2008, engineer.

Current Field of Interest and Activities: anaerobic microorganisms, methanogenic communities of microorganisms, methanogenesis, solid organic waste, wastewater treatment, nitrification, denitrification, anammox process, anammox bacteria.

Publications: 29.



Ковалев Андрей
Александрович
Andrey A. Kovalev

Сведения об авторе: ФГБНУ ФНАЦ ВИМ, старший научный сотрудник лаборатории биоэнергетических и сверхкритических технологий, кандидат технических наук.

Образование: Московский государственный университет путей сообщения (МИИТ) 2009г., инженер

Область научных интересов: возобновляемые источники энергии, анаэробная переработка отходов животноводства, производство биогаза из биомассы, теплоэнергетические установки, теплообмен.

Публикации: 54.

Индекс Хирша: РИНЦ - 5;

Scopus - 2; WoS - 1

SPIN: 4267-3026

Researcher ID: F-7045-2017

ORCID iD: 0000-0002-1983-3454

Scopus Author ID: 57205285134

Information about the author: Federal Scientific Agroengineering Center VIM, senior researcher of the laboratory of bioenergy and supercritical technologies, candidate of technical sciences.

Education: Moscow state University of railway engineering (MIIT) 2009, engineer.

Current Field of Interest and Activities: renewable energy, anaerobic digestion of animal waste, biogas production from biomass heat and power plants, heat and mass transfer.

Publications: 54.



Ковалев Дмитрий
Александрович
Dmitry A. Kovalev

Сведения об авторе: ФГБНУ ФНАЦ ВИМ, заведующий лабораторией биоэнергетических технологий, кандидат технических наук.

Образование: Московский государственный индустриальный университет (МГИУ) 2003 г., инженер.

Область научных интересов: возобновляемые источники энергии, анаэробная переработка отходов животноводства, технические инновации в сельском хозяйстве и защите окружающей среды, производство биогаза из биомассы.

Публикации: 62.

Индекс Хирша (РИНЦ): 6

SPIN: 6513-5547

Researcher ID: K-4810-2015

ORCID iD: 0000-0002-3603-3686

Information about the author: : Federal Scientific Agroengineering Center VIM, head of the laboratory of bioenergy and supercritical technologies, candidate of technical Sciences.

Education: Moscow state industrial University (MSIU) 2003, engineer.

Current Field of Interest and Activities: renewable energy, anaerobic digestion of animal waste, technical innovations in agriculture and environmental protection, the production of biogas from biomass.

Publications: 62.



Меркель Александр
Юрьевич
Alexander Y. Merkel

Сведения об авторе: ФИЦ Биотехнологии РАН, старший научный сотрудник лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов, кандидат биологических наук.

Образование: Московский государственный университет им. Ломоносова, Биологический факультет, 2008г., специальность - «Микробиология».

Область научных интересов: Молекулярные подходы в изучении экологии микроорганизмов.

Публикации: 65.

Индекс Хирша: РИНЦ - 20;

Scopus - 13; WoS - 14

SPIN: 7479-9196

Researcher ID: E-9427-2014

ORCID iD: 0000-0002-6089-9500

Scopus Author ID: 55216485500

Information about the author: Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Diversity and Ecology of Extremophilic Microorganisms, Candidate of Biological Sciences.

Education: Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 2008, specialty - Microbiology.

Current Field of Interest and Activities: Molecular approaches to the study of the ecology of microorganisms.

Publications: 65.





Вишнякова Анастасия
Валерьевна
Anastasia V. Vishnyakova

Сведения об авторе: ФИЦ Биотехнологии РАН, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания.

Образование: Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева (РХТУ) 2019г., инженер-биотехнолог

Область научных интересов: анаэробные микроорганизмы, очистка сточных вод, процесс анаммокс, анаммокс-бактерии, нитрификация, денитрификация.

Публикации: 1.

SPIN: 4278-6659

Researcher ID: AAK-9449-2021

ORCID: 0000-0002-8619-4269

Scopus Author ID: 57216345066

Information about the author: Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, junior researcher of Laboratory of Microbiology of Anthropogenic Habitats.

Education: D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (MUCTR) 2019, biotechnology engineer.

Current Field of Interest and Activities: anaerobic microorganisms, wastewater treatment, anammox process, anammox bacteria, nitrification, denitrification.

Publications: 1.

Сведения об авторе: ФИЦ Биотехнологии РАН, лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания, младший научный сотрудник.

Образование: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ) 1992 г., микробиология

Область научных интересов: анаэробные микроорганизмы, метаногенные сообщества микроорганизмов, метаногенез, анаэробная очистка сточных вод, микробиология компостирования, выделение чистых культур микроорганизмов.

Публикации: 9.

Индекс Хирша: РИНЦ - 0;

Scopus - 0; WoS - 3

Researcher ID: C-4945-2014

WoS AAK-9749-2021

ORCID: 0000-0003-1118-4127

Information about the author: Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Head of Laboratory of Microbiology of Anthropogenic Habitats, Candidate of Biological Sciences.

Education: Biological Faculty of M.V. Lomonosov Moscow State University, 1968, biochemistry.

Current Field of Interest and Activities: anaerobic microorganisms, methanogenic communities of microorganisms, methanogenesis, anaerobic wastewater treatment, microbiology of composting process, microorganisms pure cultures isolation.

Publications: 9.

Сведения об авторе: ФИЦ Биотехнологии РАН, лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания, главный научный сотрудник, доктор биологических наук

Образование: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ) 1968 г., биохимия

Область научных интересов: анаэробные микробные консорциумы, метаногенез, метаногенные сообщества микроорганизмов, биоразложение твердых органических отходов, очистка сточных вод, нитрификация, денитрификация, процесс анаммокс, анаммокс-бактерии, выделение чистых культур микроорганизмов.

Публикации: более 200.

Индекс Хирша: РИНЦ - 29;

Scopus - 28; WoS - 27

Researcher ID: D-8502-2014

ORCID: 0000-0001-9731-3895

Scopus Author ID: 35516284800

Information about the author: Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Laboratory of Microbiology of Anthropogenic Habitats, **Doctor of Science in Microbiology and Biotechnology.**

Education: Biological Faculty of M.V. Lomonosov Moscow State University, 1968, biochemistry.

Current Field of Interest and Activities: anaerobic consortiums of microorganisms, methanogenesis, methanogenic communities of microorganisms, biodegradation of solid organic waste, wastewater treatment, nitrification, denitrification, anammox process, anammox bacteria, isolation and identification of microorganisms.

Publications: more than 200.



Русскова Юлия
Игоревна
Russkova Yulia



Ножевникова Алла
Николаевна
Nozhevnikova Alla



Введение

Водород является одним из наиболее перспективных энергоносителей благодаря отсутствию углеродного следа и высокому выходу энергии. Традиционные способы получения водорода включают использование ископаемых видов топлива, таких как паровой риформинг природного газа, частичное окисление углеводородов, пиролиз биомассы или газификация угля [1]. Эти способы не отличаются экономической эффективностью и экологичностью, поскольку связаны как с использованием ископаемых видов топлива, так и с отрицательным воздействием на окружающую среду [2]. Электролиз воды позволяет получить особо чистый водород, однако его себестоимость в 3-10 раз выше, чем при получении из природного газа [3].

По сравнению с термохимическими процессами получения водорода, темновая ферментация (ТФ) является более привлекательной технологией, т.к. характеризуется энергосбережением, экологичностью, углеродной нейтральностью, относительно простыми условиями эксплуатации реакторов и низкими эксплуатационными затратами [1]. В качестве сырья для ТФ могут быть использованы различные органические отходы, например, сточные воды, осадки сточных вод (ОСВ), органическая фракция твёрдых коммунальных отходов (ОФ-ТКО) и др., что может реализовать преимущества, как производства возобновляемого ресурса, так и переработки органических отходов [4, 5]. Кроме того, растворимые побочные продукты ТФ, например, летучие жирные кислоты (ЛЖК), также являются высокоценными химическими веществами, которые могут быть потенциально использованы для синтеза биопластиков, дальнейшего производства биоэнергии (например, биометана, биоводорода и биоэлектричества) или в качестве источника органического углерода в процессе гетеротрофной денитрификации при очистке сточных вод [6].

ТФ – микробиологический процесс, за который ответственны водород-продуцирующие бактерии. В природе они не существуют изолированно и часто живут в присутствии других микроорганизмов, потребляющих водород в своих метаболических процессах, главным образом метаногенных архей и гомоацетогенов. Для элиминации водород-использующих микроорганизмов, снижающих выход водорода в процессе ТФ, существуют различные методы предварительной обработки, которые позволяют сохранить спорообразующих бактерий – продуцентов водорода, например относящихся к родам *Clostridium*, *Enterobacter* и *Bacillus* [5]. К таким методам относятся нагрев, аэрация, повышенная нагрузка по органическому веществу, обработка ультразвуком, микроволновым, УФ или ионизирующим излучением, добавление химических ингибиторов (например, хлороформа или бромэтансульфоната), щелочи или кислоты, воздействие электрическим током [7, 8]. С помощью этих методов получают смешанные культуры бактерий, например обогащен-

ные продуцентами водорода ОСВ, сброженную массу анаэробных биореакторов, навоз и др. Также для процесса ТФ используют специально выделенные чистые культуры анаэробных и факультативно анаэробных бактерий [5].

Несмотря на то, что чистые культуры позволяют получать более высокий выход водорода, их использование в основном ограничивается лабораторными исследованиями, в которых водород получают из простых углеводов, таких как глюкоза или водорастворимый крахмал. В то же время на практике процесс ТФ приходится проводить с использованием смешанных культур на субстратах, представляющих собой комплексные органические отходы, часто содержащие, помимо углеводов, большое количество белков и жиров. Преимущества использования смешанных культур включают отсутствие необходимости в асептической среде, которая необходима для монокультур, простоту управления процессом и более широкий спектр доступных субстратов [9, 10]. Кроме этого, чистые бактериальные культуры чувствительны к загрязнению потребителями водорода, включая метаногенов и гомоацетогенов. Таким образом, использование смешанных культур особенно важно при производстве водорода путем ТФ в промышленных масштабах [5].

Часто смешанные бактериальные культуры, способные к производству водорода, в изобилии встречаются в тех же отходах, из которых можно промышленно получать биоводород, например в высококонцентрированных сточных водах, ОСВ, навозе и др. Так как в полномасштабных условиях стерилизация субстрата является слишком дорогим и энергоёмким мероприятием, даже при начальном инокулировании реактора выбранными смешанными или чистыми культурами, при непрерывном процессе существует большая вероятность замещения этих культур теми культурами, которые в большом количестве содержатся в перерабатываемом органическом отходе. Через определенное время в реакторе ТФ происходит автоселекция микроорганизмов, наиболее приспособленных к заданным условиям (тип субстрата, нагрузка по органическому веществу, температура, pH и др.). Несмотря на то, что углеводы дают основной вклад в продукцию водорода [11, 12, 13], другие биополимеры, такие как белки и жиры, содержащиеся в органическом отходе, могут существенно повлиять на состав микробного сообщества реактора. Более богатый биополимерный состав, обогащение питательными элементами и факторами роста могут способствовать выживанию в сообществе тех групп микроорганизмов, которые оказывают негативное влияние на продуктивность водорода, например гомоацетогенов, метаногенов, пропионатобразующих бактерий и др. [8, 9]. Таким образом, изучение микробных сообществ в процессе ТФ с использованием в качестве субстрата простых биополимеров (углеводов, белков, жиров) и комплексных субстратов со смешанным биополимерным составом может дать представление о важной роли биополимерного состава в процессе ТФ. Несмотря на



наличие очень подробных исследований по влиянию биополимерного состава субстратов на удельный выход водорода [12, 13], в научной литературе мало внимания уделяется детальному изучению микробного сообщества, автоселекционированного из сообщества инокулята при использовании субстратов с разным биополимерным составом.

Для лучшего представления о процессе ТФ и получения основ для повышения эффективности ферментации водорода в полномасштабных условиях, в настоящей работе с помощью высокопроизводительного секвенирования проводили изучение влияния биополимерного состава простых и комплексных

субстратов на состав микробного сообщества, автоселекционированного из одного и того же инокулята – избыточного активного ила муниципальных очистных сооружений. Всесторонне проанализированы молекулярно-генетическими методами разнообразие и состав микробных сообществ. Корреляция между популяцией микроорганизмов и характеристиками процесса ТФ была оценена с использованием корреляционного анализа Спирмена. Также уделено внимание изучению изотопного состава метана, в небольших количествах образующегося в процессе ТФ, для лучшего понимания путей его образования.

Таблица сокращений	
Буквы латинского алфавита	
¹³ C	Углерод-13
pH	Водородный показатель
δ ¹³ C	Углерод-13
CH ₄	Метан
CO ₂	Диоксид углерода
α _c	Коэффициент фракционирования углерода
H ₂	Водород
OTU	Operational taxonomic unit
PCoA	Principal Coordinates Analysis
FeFe	Феррум-феррум
Аббревиатуры	
ТФ	Темновая ферментация
ОСВ	Осадки сточных вод
ОФ-ТКО	Органическая фракция твёрдых коммунальных отходов

ЛЖК	Летучие жирные кислоты
УФ	Ультрафиолет
МС	Модельный субстрат
К	Контроль
БГ	Биогаз
СВ	Сухое вещество
ОВ	Органическое вещество
ГХ	Газовый хроматограф
ГОСТ	Межгосударственный стандарт
ПНДФ	Природоохранные нормативные документы федеративные
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
рРНК	Рибосомные рибонуклеиновые кислоты
ммоль	Миллимоль
КРС	Крупный рогатый скот

1. Материалы и методы

Инокулят

В качестве инокулята – источника водородобразующих микроорганизмов, использовали ОСВ Люберецких очистных сооружений (г. Москва). Инокулят не подвергали никакой предварительной обработке (например, нагреванию, способствующему отбору спорообразующих микроорганизмов [7, 8] для лучшего отражения крупномасштабных процессов, в которых при переработке реальных органических отходов в реакторе в течение короткого начального периода осуществляется автоселекция наиболее приспособленного к заданным условиям микробного сообщества.

Субстраты

В работе использовали ряд модельных субстратов (МС), представляющих разные классы биополимеров, а также комплексные органические отходы. Модель углеводов была представлена картофельным крахмалом (МС1), белков – ферментативным пептоном (МС2), жиров – подсолнечным маслом (МС3). Для имитации биополимерного состава реальных

отходов, в частности пищевых отходов и органической фракции твердых коммунальных отходов (ОФ-ТКО), использовали смесь крахмала, масла и пептона в соотношении 7,8:5,4:1 (МС4), комбикорма для свиней с содержанием углеводов, жиров и белков в соотношении 19,0:8,4:1 (МС5) и дешевого корма для собак с содержанием углеводов, жиров и белков в соотношении 8,7:4,5:1 (МС6). Похожий биополимерный состав наблюдается в реальных ОФ-ТКО и некоторых пищевых отходах [14]. Инокулят без добавления модельных субстратов служил в качестве контроля (К).

Минеральная среда

В качестве среды для культивирования водородобразующих микроорганизмов (далее - среда) использовали среду, аналогичную [15].

Проведение эксперимента по периодической ТФ

В стеклянные флаконы общим объемом 265 мл добавляли инокулят и модельные субстраты в количестве, указанном в таблице 1. Затем общий объем жидкой фазы доводили минеральной средой до 240 мл. Газовую фазу тщательно продували аргоном,

флаконы герметично закрывали резиновыми пробками. 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 при температуре 55°C. Перемешивание осуществляли 1-2 раза в сутки путем встряхивания вручную. Регулярно измеряли объем и состав образующегося биогаза, а

также pH и содержание кислот в сбрасываемой массе. При анализе газового состава отбирали пробы как из газовой фазы флаконы, так и из мешка, для контроля однородности состава газа в них. При постановке эксперимента и после каждого промера pH жидкой фазы доводили до 5.5±0.1 путем добавления соответствующего количества 5н р-ра КОН или 5н р-ра HCL.

Таблица 1

Схема постановки эксперимента по ТФ модельных субстратов.

Table 1

The scheme of the DF experiment with the model substrates

Обозначение	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6	K
Модельный субстрат	Крахмал (картофельный)	Масло (подсолнечное)	Пептон (ферментативный)	Смесь крахмала (2,028г), масла (0,254г) и пептона (1,318 г)	Комбикорм для свиней	Корм для собак	ОСВ (инокулят)
Масса субстрата, г	3,6	3,6	3,6	3,6	10	8	-
Масса инокулята, г	55	55	55	55	55	55	55
ОВ, г/л	17,5	17,5	17,5	17,5	37,2	32,0	2,5
Соотношение субстрат: инокулят (г ОВ/г ОВ)	6	6	6	6	13,9	11,8	-
Углеводы, г	3,69	0,09	0,09	2,12	3,72	2,93	0,30
Белки, г	0,15	0,15	3,75	1,47	1,65	1,52	0,55
Жиры, г	0,02	3,62	0,02	0,27	0,20	0,34	0,05
Массовое соотношение углеводов: белки:жиры	224:9,0:1	1:1,6:38,9	5,7:227,9:1	7,8:5,4:1	19,0:8,4:1	8,7:4,5:1	5,7:9,0:1

Измерение количества образующегося биогаза и водорода

Измерение объема образующегося биогаза осуществляли с использованием трехкомпонентного шприца объемом 50 мл. Наконечник шприца присоединяли к клапану мешка с помощью силиконовой трубки. Биогаз эвакуировали из мешка путем вытягивания плунжера из цилиндра шприца. Объем эвакуированного биогаза соответствовал положению основания плунжера на шкале, нанесенной на цилиндр шприца. Количество образующегося водорода (H₂) было рассчитано исходя из измерения его объемной концентрации в биогазе (БГ) и общего объема произведенного биогаза в каждый интервал времени с использованием уравнения баланса массы:

$$V_{H_2,i} = V_{H_2,i-1} + V_{БГМ,i} * \frac{C_{H_2,i}}{100} + V_{БГФ,i} * \frac{(C_{H_2,i} - C_{H_2,i-1})}{100}; \quad (1)$$

где:

$V_{H_2,i}$ и $V_{H_2,i-1}$ - совокупные объемы водорода в текущий (i) и предыдущий (i-1) интервалы времени;

$V_{БГМ,i}$ и $V_{БГФ,i}$ - общие объемы биогаза в газовом мешке и газовой фазе флакона текущем интервале времени;

$C_{H_2,i}$ и $C_{H_2,i-1}$ - концентрации водорода в газовой фазе флакона в текущий (i) и предыдущий (i-1) интервалы времени.

Аналитические методы

Содержание сухого вещества (СВ) определяли после высушивания образца до постоянной массы при 105°C. Зольный остаток определяли при сжигании сухого образца в муфельной печи до постоянной массы при 650°C. Содержание органического вещества (ОВ) рассчитывали, как разницу между СВ и зольным остатком. Уровень pH определяли с помощью pH-метра FE20 (Mettler Toledo, Швейцария), оснащенного микроэлектродом InLab® (Mettler Toledo, Швейцария). Содержание жиров определяли по ПНДФ 14.1:2.122-97 и ГОСТ 13496.15-2016, белков – по ГОСТ 26715-85, углеводов – по ГОСТ 5903-89 и ГОСТ 26176-91. Концентрацию водорода, метана и углекислого газа в газовой фазе анализировали с помощью газового хроматографа (ГХ) Кристалл 5000.2 (Хроматэк, Россия), как описано ранее [16]. ЛЖК (этанол, ацетат, пропионат, n- и изо-бутират, n- и изо-валерат, капроат) определяли на ГХ Кристалл 5000.2 (Хроматэк, Россия), как описано ранее [17]. Содержание муравьиной, янтарной и молочной кислоты определяли с помощью системы капиллярного электрофореза Капель-205 (Люмэкс, Россия) по ГОСТ Р 56373-2015.

Содержание стабильных изотопов углерода $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ и $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$ в пробах биогаза измеряли с помощью ГХ TRACE GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Германия), оборудованного колонкой Rt-UPLOT™ и соединенного с изотопным масс спектрометром Thermo Finnigan (США). Ошибка измерения $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ и $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$ не превышала $\pm 0.1\%$. Кажущийся коэффициент фракционирования углерода (α_C) рассчитывали по формуле [18]:

$$\alpha_C = \frac{\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2 + 10^3}{\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4 + 10^3}; \quad (2)$$

где $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ и $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$ – содержание стабильных изотопов ^{13}C в суммарном CH_4 и CO_2 .

Анализ микробного сообщества

Для исследования влияния биополимерного состава субстрата на структуру микробного сообщества в процессе ТФ, после окончания стадии активного выделения водорода из образцов жидкой фазы выделяли ДНК. Выделение ДНК осуществляли по ранее описанной методике [19]. Приготовление библиотек фрагментов 16S рРНК осуществлялось путем амплификации согласно [20]. В качестве последовательностей, фланкирующих V3, использовались праймеры UNIV-515F – UNIV-806R [21]. Для постановки ПЦР использовали 5×Taq Red buffer и HS Taq полимеразу (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Конечная концентрация праймеров во всех случаях была 1 мкМ. Конечный объем реакции составлял 30 мкл. Каждый образец ДНК был амплифицирован в трех повторностях. За-

тем повторности объединяли и визуализировали в 2% агарозном геле при длине волны 470 нМ. Нужную полосу ДНК вырезали и очищали при помощи набора Standard Cleanup Gel Extraction Kit (Евроген, Россия). Для измерения концентрации ДНК использовали флуориметр Qubit® 2.0 с набором реагентов HS Assay Kit (Life Technologies, США). Перед секвенированием образцы эквимоларно смешивали и разводили полученный раствор ДНК до 4 нМ. Дальнейшую денатурацию пула библиотек и подготовку к секвенированию проводили согласно стандартному протоколу Illumina Sample Preparation Guide на платформе MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (500 циклов) (Illumina, США). Первичная обработка данных, формирование ОТЕ-таблицы, анализ таксономического состава и альфа-метрики разнообразия были проведены с помощью QIIME (версия 1.9.1; [22]) и сервиса SILVA online data analysis service [23].

2. Результаты и обсуждение**Краткая характеристика процесса ТФ**

Вследствие того, что в настоящей работе не были использованы распространённые методы предобработки инокулята для селекции спорообразующих микроорганизмов, подавление метаногенов осуществляли при помощи поддержания pH среды на уровне 5,5, который считается «золотой серединой» между:

1) pH 5.5-6.8, которые считаются оптимальным для жизнедеятельности водород-образующих бактерий [24], однако при этих же pH довольно активны водород-потребляющие микроорганизмы;

2) и pH менее 4.5, при котором происходит ингибирование как водород-образующих, так и потребляющим водород микроорганизмов из-за перехода ЛЖК в недиссоциированную форму и их проникновение в клетки через клеточную мембрану вследствие того, что внутри клеток поддерживается более высокий уровень pH [25].

Длительность производства водорода из использованных субстратов в процессе ТФ сильно отличалась друг от друга и составила для МС1, МС2, МС3, МС4, МС5 и МС6, соответственно, 42, 3, 8, 20, 10 и 32 суток. Относительно большая длительность эксперимента для некоторых субстратов, в частности МС1, МС4 и МС6 объяснялось довольно высоким содержанием ОВ (17,5-32,0 г/л), соотношением инокулята к субстрату (6-14) (табл. 1) и отсутствием активного перемешивания. В недавно предложенном протоколе для определения биоводородного потенциала рекомендуется использовать более низкую концентрацию ОВ (5 г/л), отношение субстрат/инокулят (2,7) и активное перемешивание [26], что позволило бы достичь более быстрой реализации биоводородного потенциала, в то же время это не входило в задачи настоящей работы. В таблице 2 кратко суммированы характеристики процесса ТФ.

Основные характеристики процесса ТФ с использованием модельных субстратов.

Main characteristics of the DF process with the model substrates

Использованные субстраты	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6	K
Содержание H ₂ в биогазе*, %	60,4	36,0	14,9	51,0	52,9	31,9	13,8
мл H ₂ / г ОВ	138	4,9	4,1	59,5	43,6	63,3	16,2
ммоль H ₂ / г углеводов	6,16	0	0	4,51	4,36	6,82	4,66
Этанол**, мг/г ОВ	16,0	0,0	6,3	6,9	7,5	32,2	116,0
Ацетат**, мг/г ОВ	220,6	18,9	135,4	141,7	63,3	35,6	180,0
Пропионат**, мг/г ОВ	5,1	0,0	12,0	8,6	1,1	0,0	0,0
Бутират**, мг/г ОВ	120,0	12,6	33,1	61,7	73,8	47,2	400,0
Валерат**, мг/г ОВ	2,9	7,4	16,0	7,4	3,0	0,0	0,0
Капронат**, мг/г ОВ	4,0	0,0	0,0	12,0	8,3	0,0	0,0
Лактат**, мг/г ОВ	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0
Сукцинат**, мг/г ОВ	0,6	1,1	33,7	12,6	1,3	1,2	0,0
Формиат**, мг/г ОВ	3,4	0,6	0,0	0,6	0,3	0,0	0,0
Ацетат/бутират	1,84	1,50	4,09	2,30	0,86	0,75	0,45

Примечание: * - в суммарном биогазе до прекращения образования водорода; ** - разница между конечной и начальной концентрацией.

Микробное разнообразие сообществ

Для оценки влияния биополимерного состава простых субстратов и комплексных органических отходов на состав микробного сообщества в конце активной стадии образования водорода из соответ-

ствующих флаконов были отобраны усредненные (по повторностям) образцы биомассы и проанализированы с помощью высокопроизводительного секвенирования. Таблица 3 иллюстрирует индексы микробного разнообразия для шести использованных субстратов.

Таблица 3

Индексы биоразнообразия при ТФ модельных субстратов.

Table 3

Biodiversity Indices for the DF of model substrates

Субстраты	Прочтения	OTU	Покрывтие	Simpson	Shannon
MC1	8531	87	0.99	0.77	0,45
MC2	8401	525	0.96	0.10	3,27
MC3	9750	700	0.96	0.14	3,85
MC4	9217	237	0.99	0.53	1,08
MC5	8317	347	0.98	0.17	2,35
MC6	9135	214	0.99	0.42	1,32

Как показано в таблице 3, для MC1, MC2, MC3, MC4, MC5 и MC6 были получены 8531, 8401, 9750, 9217, 8317 и 9135 высококачественных последовательностей, соответственно. 87, 525, 700, 237, 347 и 214 OTU были получены, соответственно для MC1,

MC2, MC3, MC4, MC5 и MC6. Кроме того, значения покрытия для всех образцов были выше, чем 0,96 в настоящей работе (таблица 3). Это указывает на то, что глубина секвенирования для всех образцов была

достаточной для представления микробного сообщества.

Альфа-разнообразию для каждого субстрата оценивали по показателям разнообразия Симпсона и Шеннона. Более низкий индекс Симпсона или более высокий индекс Шеннона указывают на большее микробное разнообразие. При использовании модели жиров (MC2) и белков (MC3) наблюдалось наиболее разнообразное сообщество, за которыми следовал комплексный субстрат MC5 (корм для свиней). Наименьшее разнообразие наблюдалось в субстратах, содержащих много крахмала (MC1 и MC4), а также в MC6 (корм для собак). Интересно, что между микробным разнообразием и длительностью производства водорода наблюдалась четкая отрицательная

корреляция. Это позволяет говорить о том, что более разнообразное сообщество быстрее реализует водородный потенциал субстрата, и хорошо согласуется с тем, что одно из преимуществ использования смешанных культур для процесса ТФ состоит в более широком спектре доступных субстратов [9, 10].

Бета-разнообразию использовалось для оценки изменений микробных сообществ среди использованных субстратов. В настоящей работе Бета-разнообразию было интерпретировано с помощью PCoA (рис. 1). Жиры (MC2) и белки (MC3) были значительно отделены от субстратов, богатых углеводами, что указывает на то, что различные биополимеры способствовали автоселекции разных микробных сообществ в системе ТФ.

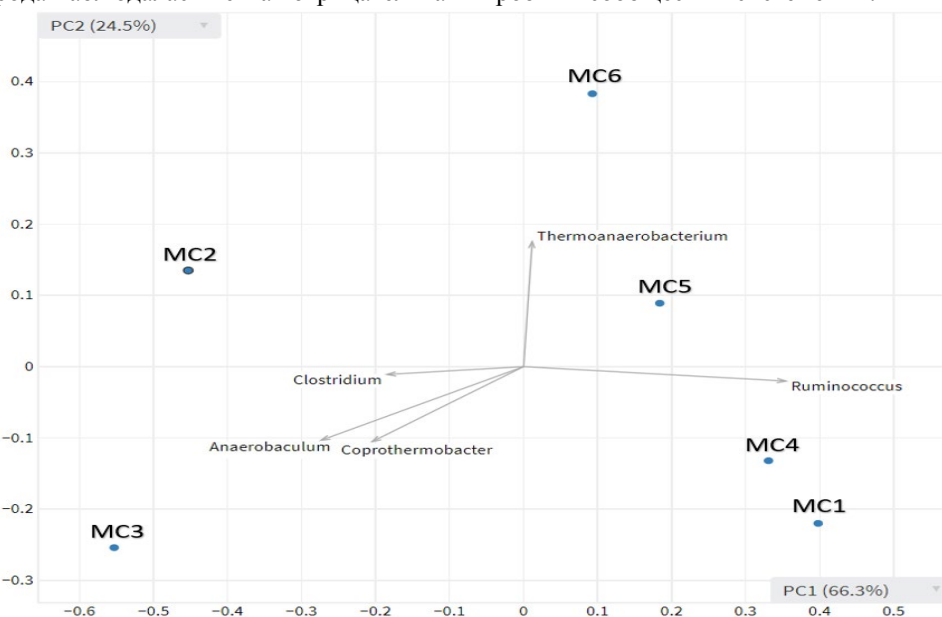


Рис. 1. Различия микробных сообществ в процессе ТФ с использованием MC1, MC2, MC3, MC4, MC5 и MC6 в качестве субстратов.

Fig.1. Differences between the microbial communities in the DF process with MC1, MC2, MC3, MC4, MC5, MC6 used as the substrates.

Для дальнейшего изучения состава микробного сообщества и доминирующих групп микроорганизмов в образцах с использованием разных простых и комплексных субстратов был проведен филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК на уровнях филума и рода, результаты которого представлены на рис. 2. На уровне филума в выбранных условиях ТФ (контроль рН на уровне 5,5, температура 55°C, низкоинтенсивное перемешивание, атмосферное давление в газовой фазе) доминирующим таксоном был *Firmicutes* (рис. 3А). Наибольшая представленность *Firmicutes* наблюдалась при ТФ субстратов с высоким содержанием углеводом, достигая почти 100% в опытах с MC1, MC4, MC5 и MC6. В то же время необходимо отметить, что и при использовании MC2 и MC3 в качестве субстратов, относительное содержание *Firmicutes* составляло, соответственно, 71% и 67%, что говорит о крайне важной роли этого филума в системах ТФ независимо от биополимерного состава. В состав филума *Firmicutes* входят основные грамм-положительные

продуценты водорода [8, 9]. *Clostridia* и *Bacilli*, относящиеся к *Firmicutes*, доминировали в микробном сообществе длительно функционирующих биореакторов ТФ, перерабатывающих различные сточные воды [27]. Высокая представленность *Firmicutes* в системах ТФ объясняется большим разнообразием гидрогеназ, которыми они обладают [28], в частности (FeFe)-гидрогеназ [29]. Филум *Proteobacteria*, довольно широко представленный при ТФ белков (MC3) (16%) и в меньшей степени при ТФ жиров (MC2) (3%), включают широкий спектр анаэробных, факультативно-анаэробных и аэробных грамм-отрицательных бактерий, использующих различные органические субстраты и образующих ЛЖК [30]. Представители *Proteobacteria* являются активными продуцентами водорода из-за наличия у них (FeFe)-гидрогеназ [29]. Показано, что *Proteobacteria* доминировали при использовании в качестве инокулята эффлюента анаэробного реактора, не подвергнутого предварительной кислотной обработке [27]. Примерно одинаковое относительное содержание предста-



вителей филума *Synergistaceae*, составлявшее, соответственно, 14% и 16%, наблюдалось в микробном сообществе, автоселекционировавшемся при ТФ МС2 и МС3, и значительно ниже (2%) в МС4. *Synergistaceae* является недавно признанным филумом анаэробных бактерий, отрицательно окрашивающихся по Грамму [31], представители которых играют важную роль в биодеградации ОСВ в анаэробных реакторах и являются потенциальными кандидатами для использования в качестве продуцентов водорода [32]. *Synergistaceae* известны своей способностью расщеплять аминокислоты до ЛЖК [33, 34], однако некоторые виды могут также ферментировать ЛЖК через синтрофные взаимоотношения с метаногенами [35]. Следовательно, роль представителей этого филума в сообществе, разлагающем белки (МС3) и жиры (МС2) в процессе ТФ, может быть связана с синтрофным окислением ацетата и других ЛЖК [36]. При использовании МС3 наблюдалась относительно высокая (8%) представленность филума *Coprothermobacterota*, которых связывают с высоким содержанием белков в перерабатываемых отходах [37, 38]. Несмотря на то, что среди продуктов ферментации белков есть водород, склонность *Coprothermobacterota* образовывать синтрофные связи с водород-использующими археями [39] может негативно сказываться на продуктивности водорода в системах ТФ. Кроме того, небольшая доля (0,4-0,5%) *Actinobacteria* наблюдалась в микробном сообществе при ТФ модели жиров (МС2) и белков (МС3). Относительно недавно было показано, что их представитель *Streptomyces rubiginosus* может вырабатывать водород из патоки сахарного тростника [40]. Относительное содержание остальных филумов, а именно *Epsilonbacteraeota*, *Thermoleophilia*, *Microtrichales* и *Coriobacteriia*, было незначительным (0,1% и менее).

Доминирующие микроорганизмы на уровне родов

Различие в биополимерном составе субстратов сильно отразилось на разнообразии доминирующих микроорганизмов на уровне рода (Рис. 2Б). Наиболее разнообразными были микробные сообщества при ТФ белков (МС3) и жиров (МС2). Количество родов, превышающих 1%, составляло 10 и 11, соответственно, при ТФ МС2 и МС3. При использовании МС2 наиболее представленным родом был *Thermoanaerobacterium* (21%), за которым следовали *Thermobrachium* (19%), *Tepidiphilus* (16%), *Acetomicrobium* (14%), *Romboutsia* (9%), *Clostridium sensu stricto 7* (7%) и *Clostridium sensu stricto 1* (3%) (Рис. 2Б). Другие роды присутствовали в минорных количествах с относительным содержанием 2% и менее. Наиболее представленным родом при использовании МС3 был *Thermobrachium* (34%), за которым следовали *Acetomicrobium* (16%), *Clostridium sensu stricto 7* (12%), *Romboutsia* (9%) и *Coprothermobacter* (8%). Другие роды присутствовали в минорных количествах с относительным содер-

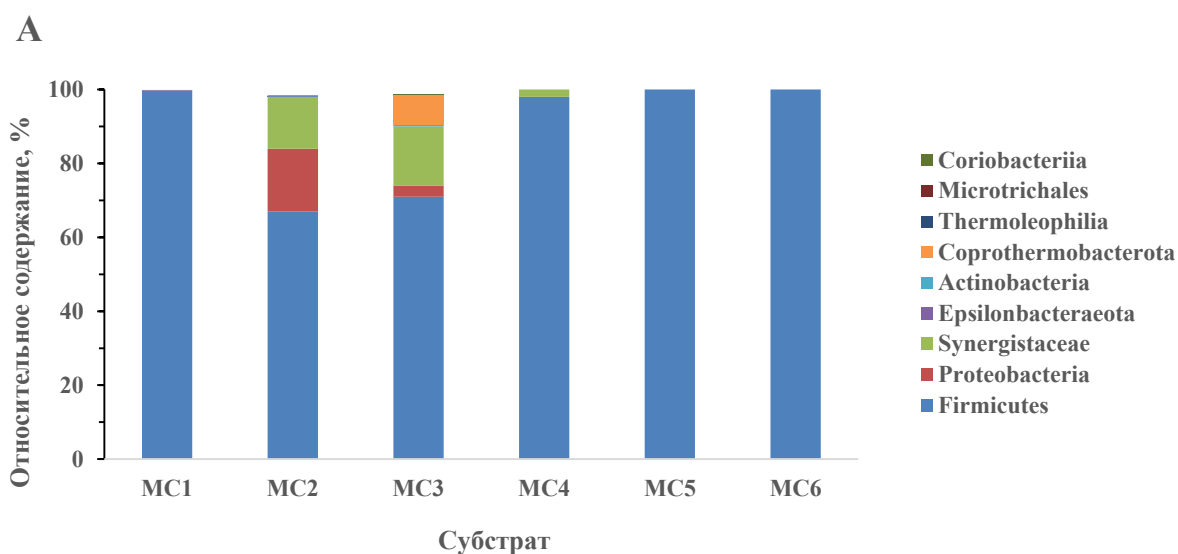
жением 2% и менее. При использовании субстратов, содержащих углеводы (МС1) как моно субстрат, либо с большим его содержанием (МС4, МС5, МС6), разнообразие родов было очень низким. В частности, при ТФ МС1, 90% всех OTU принадлежало представителям рода *Ruminococcus*, за которым следовали *Thermoanaerobacterium* (6%) и *Ruminiclostridium* (3%) (Рис. 2Б). Чуть более разнообразным было микробное сообщество при ТФ МС4. Также как и в МС1, наиболее представленным родом в МС4 был *Ruminococcus* (73%), за которым следовали *Thermoanaerobacterium* (13%), *Acetomicrobium* (2%) и *Romboutsia* (2%) (Рис. 2Б). Остальные роды составляли 1% сообщества и менее. При использовании комплексного субстрата с похожим биополимерным составом, а именно МС6, содержащих углеводы, белки и жиры в соотношении 8,7:4,5:1, в микробном сообществе увеличивалась доля *Thermoanaerobacterium* и снижалась доля *Ruminococcus*, соответственно, до 67% и 26%. Три других рода, входящих в филум *Firmicutes*, а именно *Romboutsia*, *Clostridium sensu stricto 7* и *Clostridium sensu stricto 1*, составляли минорную часть микробного сообщества, с относительным содержанием 3%, 1% и 1%, соответственно (Рис. 2Б). При использовании МС5, содержащего углеводы, белки и жиры в соотношении 19,0:8,4:1, также доминировали представители двух родов: *Ruminococcus* (42%) и *Thermoanaerobacterium* (22%). Однако, в отличие от использования других субстратов, при ТФ МС5 также было много представителей родов *Bacillus* (15%) и *Moorella* (9%), за которыми следовали *Romboutsia* (5%) и *Clostridium sensu stricto 7* (2%), а остальные роды были представлены в минорных количествах (1% и менее) (Рис. 2Б).

Из представленных данных очевидно, что при использовании активного ила в качестве инокулята, доминирующими родами при ТФ субстратов, богатых углеводами, являются *Ruminococcus* и *Thermoanaerobacterium*. Наиболее известный представитель *Ruminococcus*, *R. albus*, считается перспективным продуцентом водорода за его способность утилизировать как гексозы, так и пентозы, при этом выход водорода из достигает 2,52 моль/моль глюкозы [41]. Различные представители *Thermoanaerobacterium* по праву считаются супер-продуцентами водорода и широко используются для получения водорода и термостабильных ферментов из самых разнообразных субстратов, богатых углеводами, включающих глюкозу, ксилозу, ксилан, сахарозу, кукурузные стебли, целлюлозу, пшеничную солому, отходы производства пальмового масла и др. [42, 43, 44, 45]. Доминирование *Thermoanaerobacterium*, а также *Caproiciproducens* (из семейства *Ruminococcaceae*) наблюдалось в микробном сообществе ТФ реактора при увеличении доли бумажных отходов в смеси с пищевыми отходами, с использованием мезофильно сброженного ОСВ в качестве инокулята [46]. Представители рода *Bacillus* (15% в МС5), как известно, обладают разнообразным метаболизмом, и способны к образованию

водорода из широкого спектра простых (глюкоза, ксилоза, арабиноза, лактоза, сахароза и крахмал) и комплексных субстратов, богатых углеводами (гидролизат жома сахарного тростника, патока, кожура картофеля, биомасса цианобактерий, ОФ-ТКО) [47, 48]. Ацетогенные *Moorella* (9% в МС5) могут ферментировать углеводы как с образованием водорода [49], так и без образования водорода [49, 50]. В то же время, способность потреблять водород в смеси с CO [49] и CO₂ [51] делает представителей рода *Moorella* не очень желательными микроорганизмами в реакторах, осуществляющих ТФ.

Как было отмечено выше, в отличие от ТФ богатых углеводами субстратов, в МС2 (жиры) и МС3 (белки) наблюдалось высокое микробное разнообразие. Единственный известный представитель *Thermobrachium*, *T. celere* при разложении глюкозы в присутствии дрожжевого экстракта образует CO₂, H₂, ацетат, формиат и этанол [52]. Благодаря высокой скорости биохимических процессов и способности расти в экстремальных условиях, *T. celere* считается хорошим кандидатом для производства водорода в нестерильных условиях при переработке реальных органических отходов [53]. Представители рода *Acetomicrobium* известны своей способностью к производству водорода. Относительно недавно описанный вид *A. hydrogeniformans* способен производить почти четыре молекулы водорода на молекулу глюкозы, что является теоретическим максимумом. Также он сбраживает другие субстраты, в том числе аминокислоты, дикарбоновые кислоты и другие сахара [54]. В геномах *Romboutsia hominis FRIFIT* и *Romboutsia lituseburensis A25KT 448* был идентифицирован кластер гена, кодирующего нитрогеназу [55], что говорит об их потенциальной способности продуцировать водород. В литературе практически нет упоминаний о присутствии *Clostridium sensu stricto 7* в системах ТФ. В то же время валидно описанный па-

тогенный *Clostridium novyi*, входящий в кластер *Clostridium sensu stricto 7* согласно базе данных Silva [23], активно продуцирует водородсодержащий газ благодаря наличию генов, кодирующих мономерные (FeFe) гидрогеназы [28]. Доминирование потенциально опасных *Clostridium novyi* с высоким относительным содержанием 65% было показано в эффлюенте одного из промышленных анаэробных реакторов, перерабатывающих свиной навоз и кукурузный силос [56]. Однако рост *Clostridium novyi* ингибируется при температуре выше 46°C [57], что делает маловероятным его присутствие в настоящей работе. Представители рода *Coprothermobacter* (8% OTU в МС3) часто выявляются в микробном сообществе термофильных [37, 38] и гипертермофильных [58] реакторов, перерабатывающих богатые белками отходы кожевального производства и навоз КРС [37, 38], а также сточные воды производства биоэтанола [58]. *Coprothermobacter proteolyticus* использует сахара при наличии в среде дрожжевого экстракта и рубцовой жидкости или триптиказного пептона [37]. *Coprothermobacter platensis* способен разлагать комплексные субстраты, в том числе желатин, казеин, бычий альбумин, пептон, дрожжевой экстракт и сахара. При этом основными продуктами брожения глюкозы являются ацетат, CO₂ и H₂ [38]. Отдельные представители рода *Tepidiphilus* (16% OTU в МС2), например *Tepidiphilus margaritifera*, обладают гидрогеназной активностью, поэтому также могут быть потенциальными продуцентами водорода [59]. *Clostridium sensu stricto 1* (0,7-3,0% OTU) являются активными продуцентами водорода [60] и играют важную роль в системах ТФ различных отходов [61, 62]. Представители этого рода являлись основными продуцентами водорода из глюкозы при использовании мезофильно сброженного ОСВ, подвергнутого тепловой обработке [61].



Б

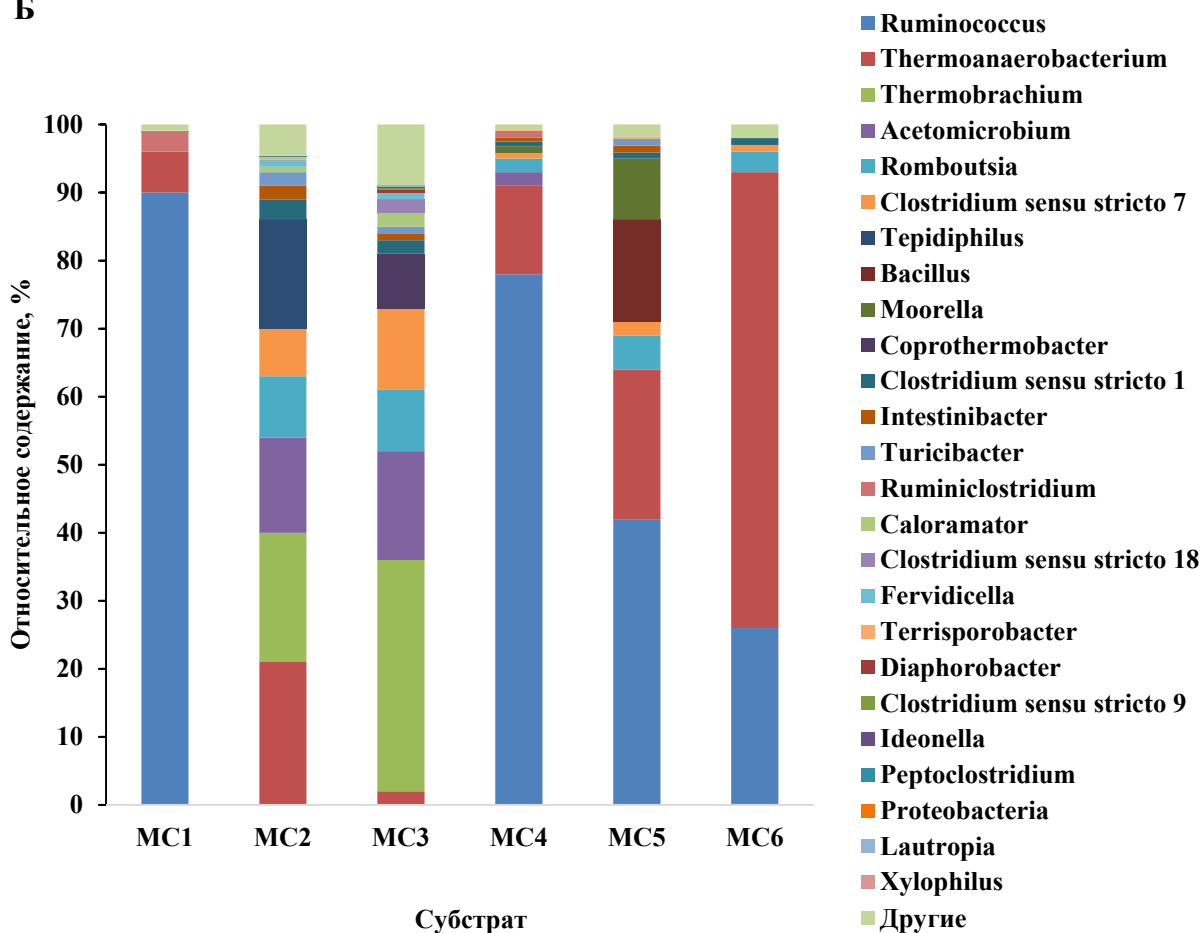


Рис.2. Составы микробных сообществ на уровнях филума (А) и рода (В) в процессе ТФ простых и комплексных субстратов с разным биополимерным составом.

Fig. 2. Compositions of microbial communities at phylum (A) and genus (B) levels during DF of simple and complex substrates with different biopolymer composition.

Определение функциональных групп микроорганизмов

Для лучшего понимания функции отдельных микробных групп в процессе ТФ, были проанализированы возможные взаимосвязи между основными родами (Рис. 2Б) и характеристиками процесса ТФ (табл. 2). На рис. 4 представлена корреляция Спирмена в виде тепловой карты, которая показывает, что род *Ruminococcus* внес основной вклад в удельный выход водорода и высокое содержание водорода в биогазе. Статистически значимая положительная корреляция наблюдалась между относительным содержанием в микробном сообществе представителей

рода *Ruminococcus* и концентрацией углеводов, рода *Bacillus* с накоплением лактата и рода *Acetomicrobium* с накоплением валерата. Статистически значимая отрицательная корреляция наблюдалась между относительным содержанием представителей родов *Thermobrachium*, *Acetomicrobium*, *Romboutsia*, *Clostridium sensu stricto 7*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Caloramator* и *Fervidicella* с одной стороны, и удельным выходом водорода и содержанием углеводов в субстрате, с другой стороны. Этот результат объясняется тем, что перечисленные таксоны в основном были представлены при ТФ субстратов с низким содержанием углеводов.



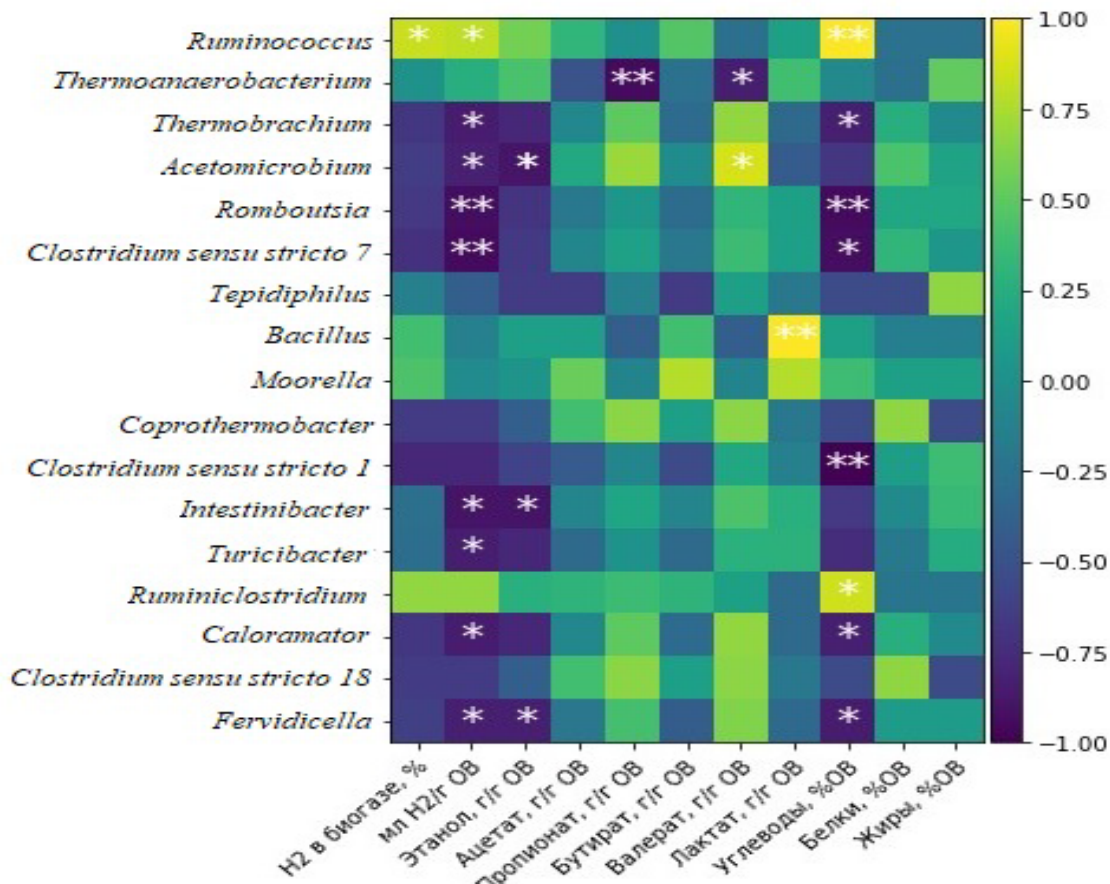
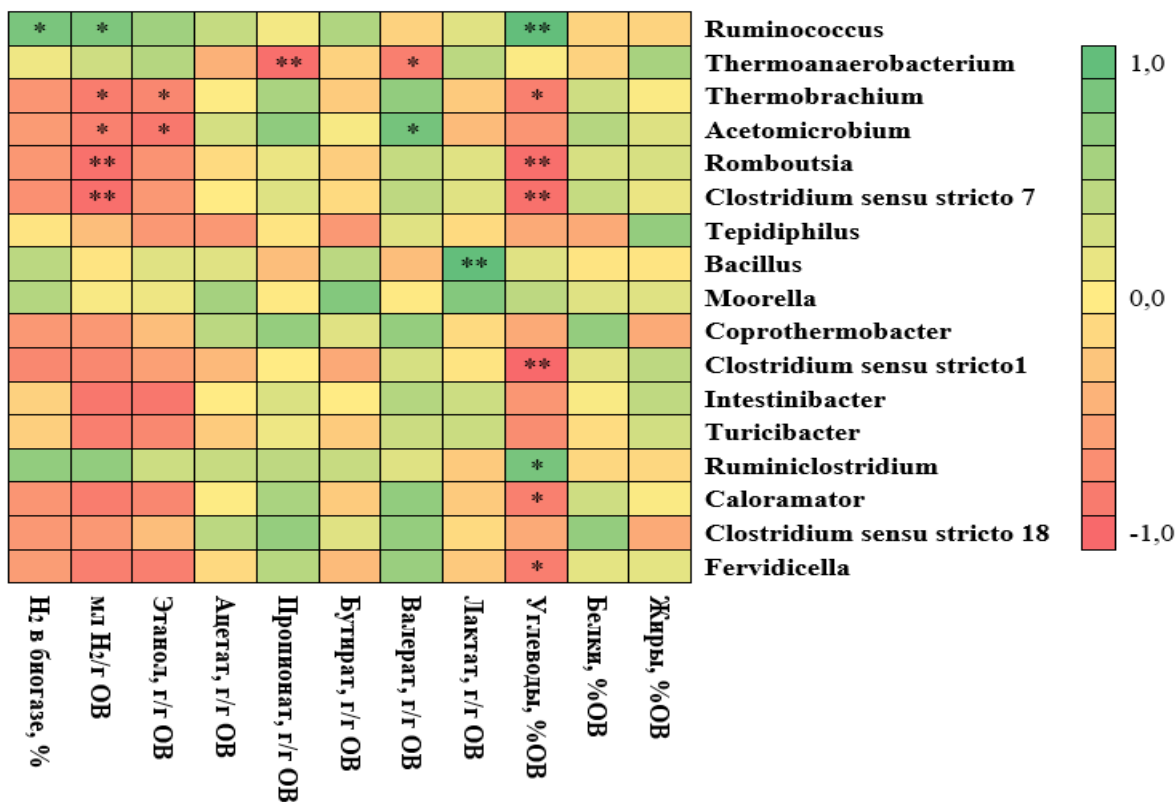


Рис. 4. Тепловая карта корреляции Спирмена между микроорганизмами на уровне рода и биополимерным составом субстратов, а также параметрами процесса ТФ. Статистически значимые значения обозначены символами: ** P < 0,01; * P < 0,05. Fig. 4. The heat map of the Spearman correlation analysis of microorganisms abundance at the order level, the biopolymer composition of substrates, and the DF process parameters. Statistically significant values are indicated by symbols: ** P < 0,01; * P < 0,05.



Архейное сообщество и оценка путей образования метана

Следует отметить, что подобранные для проведения процесса ТФ условия позволили эффективно и практически полностью подавить активность метаногенов в настоящей работе. Результаты филогенетического анализа последовательностей генов 16S рРНК при использовании богатых углеводами субстратов показали полное отсутствие архей. При использовании жиров (МС2) образование водорода прекратилось на 8-ые сутки, после чего через 1-2 суток в газовой фазе начала расти концентрация метана. Несмотря на относительно высокое содержание метана (до 26%) в биогазе, выход метана количественно был очень мал и осуществлялся водород-использующими *Methanothermobacter* (86% архейной составляющей), а также *Methanosarcina* (14% архейной составляющей), способными потреблять разные субстраты. В то же время, количественно археи составляли только 0.1% всего микробного сообщества, как в МС2, так и в МС3. Выход водорода при ТФ белков (МС3) практически прекратился на 3-ьи сутки инкубации, на 7-ые сутки начала возрастать концентрация метана (до 46%) в образующемся биогазе. Все идентифицированные метаногены относились к водород-потребляющим *Methanothermobacter*.

Для получения дополнительной информации о путях образования метана в системе ТФ, 10 образцов

биогаза из МС2 и МС3, содержащих концентрацию метана более 0.5%, были проанализированы на состав стабильных изотопов $\delta^{13}\text{C}$. Пути метаногенеза можно оценить по кажущемуся коэффициенту фракционирования α_C (ур. 2). Чем больше значение α_C , тем большим является вклад водородотрофного пути в общее производство метана. Принято считать, что при $\alpha_C > 1,065$, $\alpha_C < 1,025$ и α_C около 1,045 образование метана идет, соответственно, по водородотрофному, ацетокластическому и смешанному пути [18]. Исходя из данных в табл. 4, метаногенез в процессе ТФ МС2 и МС3 шел по смешанному пути с небольшим преобладанием водородотрофного пути. Образование части метана из ацетата, видимо, связано с наличием в архейном сообществе представителей *Methanosarcina*, известных своей способностью переносить стрессовые факторы, такие как высокие концентрации аммония и солей, шоковые изменения рН и нагрузки по ОВ [63]. В то же время, образование метана в нашей работе стало активным только после прекращения образования водорода и снижения его концентрации в биогазе ниже 3%. Одной из причин, вероятно, было то, что слишком высокое парциальное давление водорода в газовой фазе ингибировало ацетокластический метаногенез. В частности, такой эффект был показан для представителей *Methanosarcina* в работе [64].

Таблица 4

Показатели стабильных изотопов $\delta^{13}\text{C}$ в процессе ТФ с использованием в качестве субстратов подсолнечного масла и пептона. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n = 5).

Table 4

Stable isotopes $\delta^{13}\text{C}$ in the DF with sunflower oil (MS2) and peptone (MS3) as substrates. The data are presented as average value \pm standard deviation (n = 5)

Параметр	МС2	МС3
$\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$	-62,23 \pm 1,15	-62,23 \pm 0,79
$\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$	-13,19 \pm 0,90	-17,47 \pm 4,05
α_C	1,052 \pm 0,001	1,048 \pm 0,004

Заключение

Результаты исследования показали, что независимо от биополимерного состава субстратов в микробном сообществе доминировали представители *Firmicutes* (67-100%), что говорит о крайне важной роли этого филума для процесса ТФ. *Ruminococcus* (26-90%) и *Thermoanaerobacterium* (6-67%) доминировали при ТФ субстратов, богатых углеводами. В отличие от углеводов, ТФ жиров и белков характеризовалась большим микробным разнообразием. При использовании жиров доминировали *Thermoanaerobacterium* (21%), *Thermobrachium* (19%), *Tepidiphilus* (16%) и *Acetomicrobium* (14%), а при использовании белков - *Thermobrachium* (34%), *Acetomicrobium* (16%) и *Clostridium sensu stricto* 7 (12%). Максимальным был выход водорода из крахмала (138 мл/г ОВ), мини-

мальный – из жиров (4,9 мл/г ОВ) и белков (4,1мл/г ОВ). *Ruminococcus* внес основной вклад в высокий удельный выход водорода и содержание водорода в биогазе. Минорные количества метана при ТФ белков и жиров были образованы *Methanothermobacter* и *Methanosarcina*, с небольшим преобладанием водородотрофного пути, согласно анализу стабильных изотопов ^{13}C .

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Список литературы

1. Kothari R., D. Buddhi, R.L. Sawhney, Comparison of environmental and economic aspects of various hydrogen production methods. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 12 (2008) 781 553-563. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.07.012>.
2. Abbasi T., Abbasi S.A. 'Renewable' hydrogen: Prospects and challenges, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15 (2011) 3034-3040. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.02.026>.
3. Khan MA, Ngo HH, Guo W, Liu Y, Zhang X, Guo J, Chang SW, Nguyen DD, Wang J, Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy, *Renewable Energy* 2018 V. 129B. Pp. 754-768. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.029>.
4. Wang JL, Yin Y. Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock. *Renew Sustain Energy Rev* 2018; 92:284-306. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0871-5>.
5. Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>.
6. Elbeshbishy E, Dhar BR, Nakhla G, Lee HS. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 2017; 79:656-68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>.
7. Wang JL, Yin YN. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2017; 42:4804e23. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.135>.
8. Wong YM, Wu TY, Juan JC. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 2014; 34:471–82. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>.
9. Li C, Fang HHP. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2007; 37:1–39. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>.
10. Valdez-Vazquez I, Ríos-Leal E, Esparza-García F, Cecchi F, Poggi-Varaldo HM. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *Int J Hydrog Energy* 2005; 30:1383–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.016>.
11. De Gioannis, G., Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., 2013. A review of dark fermentation hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Manage.* 33, 1345–1361. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.02.019>.
12. Kobayashi, T., Xu, K.-Q., Li, Y.-Y., Inamori, Y., 2012. Evaluation of hydrogen and methane production from municipal solid wastes with different compositions of fat, protein, cellulose materials and the other carbohydrates. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15711–15718. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.044>.
13. Alibardi, L., & Cossu, R. (2016). Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Management*, 47, 69–77.
14. Campuzano & González-Martínez, S. (2016). Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Management*, 54, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>.
15. Wei S Z, Xiao B Y, Liu J X. Impact of alkali and heat pretreatment on the pathway of hydrogen production from sewage sludge. *Chinese Sci Bull*, 2010, 55: 777–786. <https://doi.org/10.1007/s11434-009-0591-7>.
16. Lokshina, L., Vavilin, V., Litt, Y., Glagolev, M., Sabrekov, A., Kotsyurbenko, O., & Kozlova, M. (2019). Methane Production in a West Siberian Eutrophic Fen Is Much Higher than Carbon Dioxide Production: Incubation of Peat Samples, Stoichiometry, Stable Isotope Dynamics, Modeling. *Water Resources*, 46(S1), S110–S125. <https://doi.org/10.1134/S0097807819070133>.
17. Litt Y., Nikitina A., Kovalev D., Ermoshin A., Mahajan R., Gunjan G., Nozhevnikova A. Influence of cationic polyacrilamide flocculant on high-solids' anaerobic digestion of sewage sludge under thermophilic conditions, *Environmental Technology*. 2017. Dec 14:1-26 <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1417492>.
18. Conrad, R. Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal. *Org. Geochem.* 36, 739–752 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.09.006>.
19. Lever M.A., Torti A., Eickenbusch P., Michaud A.B., Šantl-Temkiv T., Jørgensen B.B. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types // *Front Microbiol.* 2015. V. 6. P. 476. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00476>.
20. 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. 6. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>.
21. Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S.M., Betley J., Fraser L., Bauer M., Gormley N., Gilbert J.A., Smith G., Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms // *ISME J.* 2012. V. 6(8). P. 1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.
22. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J.A., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R.. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods.* 2010 V. 7. P. 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.



23. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
24. Liu I.C., Whang L.-M., Ren W.-J., Lin P.-Y. The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations, *Int. J. Hydrogen Energ.* 36 (2011) 439-449 <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.10.045>.
25. Bundhoo M.A.Z., Mohee R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review, *Int. J. Hydrogen Energ.* 41 (2016) 6713-6733. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>.
26. Carrillo-Reyes J, Buitrón G, Moreno-Andrade I, Tapia-Rodríguez AC, Palomo-Briones R, Razo-Flores E, Juárez OA, Arreola-Vargas J, Bernet N, Braga AFM, Braga L, Castelló E, Chatellard L, Etchebere C, Fuentes L, León-Becerril E, Méndez-Acosta HO, Ruiz-Filippi G, Venegas ET, Trably E, Wenzel J, Zaiat M, Standardized protocol for determination of biohydrogen potential, *MethodsX* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.027>.
27. Goud, R.K., Venkata Mohan, S., 2012. Acidic and alkaline shock pretreatment to enrich acidogenic biohydrogen producing mixed culture: Long term synergistic evaluation of microbial inventory, dehydrogenase activity and bioelectro kinetics. *RSC Adv.* 2, 6336–6353. <https://doi.org/10.1039/C2RA20526B>.
28. Calusinska, M., Happe, T., Joris, B., Wilmotte, A., 2010. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: A comparative genomic perspective. *Microbiology* 156, 1575–1588. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032771-0>.
29. Meyer, J., 2007. (FeFe) hydrogenases and their evolution: A genomic perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (9), 1063–1084. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6477-4>.
30. Laothanachareon T, Kanchanasuta S, Mhuanthong W, Phalakornkule C, Pisutpaisal N, Champreda V. Analysis of microbial community adaptation in mesophilic hydrogen fermentation from food waste by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *J Environ Manag* 2014; 144:143-51. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.019>.
31. Jumas-Bilak, E.; Roudiere, L.; Marchandin, H. (2009). "Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family Syntrophomonadaceae, phylum 'Firmicutes'". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1028–1035. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.006718-0>.
32. Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., and Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J.* 3, 700–714. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.2>.
33. Dahle H, Birkeland N-K (2006) *Thermovirga lienii* gen. Nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a North Sea oil well. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1539–1545. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63894-0>.
34. Honda T, Fujita T, Tonouchi A (2013) *Aminivibrio pyruvatiphilus* gen. Nov., sp. nov., an anaerobic, amino-acid-degrading bacterium from soil of a Japanese rice field. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 3679–3686. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.052225-0>.
35. Meng X, Yuan X, Ren J, Wang X, Zhu W, Cui Z (2017) Methane production and characteristics of the microbial community in a two stage fixed-bed anaerobic reactor using molasses. *Bioresour Technol* 241:1050–1059. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.181>.
36. Yi, Y., Wang, H., Chen, Y., Gou, M., Xia, Z., Hu, B., ... Tang, Y. Identification of Novel Butyrate- and Acetate-Oxidizing Bacteria in Butyrate-Fed Mesophilic Anaerobic Chemostats by DNA-Based Stable Isotope Probing. *Microb Ecol* 79, 285–298 (2020) <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01400-z>.
37. Bernard M. Ollivier, Robert A. Mah, Thomas J. Ferguson, David R. Boone, J.L. Garcia, and Ralph Robinson. Emendation of the Genus *Thermobacteroides*: *Thermobacteroides proteolyticus* sp. nov., a Proteolytic Acetogen from a Methanogenic Enrichment. *International Journal of Systematic Bacteriology*. October 1985 vol. 35 no. 4 425-428 <https://doi.org/10.1099/00207713-35-4-425>.
38. Etchebere, C; Pavan, M. E.; Zorzopulos, J.; Soubes, M.; Muxi, L. (1998). "Coprothermobacter platensis sp. nov., a new anaerobic proteolytic thermophilic bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 48 (4): 1297–1304. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1297>.
39. Sasaki K, Morita M, Sasaki D, Nagaoka J, Matsumoto N et al. Syntrophic degradation of proteinaceous materials by the thermophilic strains *Coprothermobacter proteolyticus* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *J Biosci Bioeng* 2011; 112:469–472. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.07.003>.
40. Sivarajan, A., Shanmugasundaram, T., Thirumalairaj, J., & Balagurunathan, R. (2016). Production and optimization of biohydrogen from saccharolytic actinobacterium, *Streptomyces rubiginosus* (SM16), using sugarcane molasses. *Biofuels*, 8(6), 717–723. <https://doi.org/10.1080/17597269.2016.1257317>.
41. Ntaikou, I., Gavala, H. N., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008). Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1153–1163. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.10.053>.
42. Sheng T, Gao L, Zhao L, Liu W, Wang A. Direct hydrogen production from lignocellulose by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain DD32. *RSC Adv.* 2015; 5:99781–8. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0692-y>.
43. Cao G, Ren N, Wang A, Lee D-J, Guo W, Liu B, et al. Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Int J Hydrogen Energy*.

2009; 34:7182–8.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.009>.

44. Mamimin C, Jehlee A, Saelor S, Prasertsan P, Sompong O. Thermophilic hydrogen production from co-fermentation of palm oil mill effluent and decanter cake by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *Int J Hydrogen Energy*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.152>.

45. Zhao Lei, Chen Chuan, Ren Hong-Yu, Wang Zi-Han, Wu Kai-Kai, Meng Jia, Cao Guang-Li, Ren Nan-Qi, Ho Shih-Hsin Unraveling hydrogen production potential by glucose and xylose co-fermentation of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 and its metabolisms through transcriptomic sequencing // *Int. J. Energy Res.*2020. <https://doi.org/10.1002/er.5468>.

46. Qin, Y., Li, L., Wu, J., Xiao, B., Hojo, T., Kubota, K., Li, Y.-Y. (2019). Co-production of biohydrogen and biomethane from food waste and paper waste via recirculated two-phase anaerobic digestion process: Bioenergy yields and metabolic distribution. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.004>.

47. Sinha, P., & Pandey, A. (2014). Biohydrogen production from various feedstocks by *Bacillus firmus* NMBL-03. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(14), 7518–7525.

48. Shah, A. T., Favaro, L., Alibardi, L., Cagnin, L., Sandon, A., Cossu, R., ... Basaglia, M. (2016). *Bacillus* sp. strains to produce bio-hydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. *Applied Energy*, 176, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.05.054>

49. Alves, J. I., van Gelder, A. H., Alves, M. M., Sousa, D. Z., & Plugge, C. M. (2013). *Moorella stamsii* sp. nov., a new anaerobic thermophilic hydrogenogenic carboxydotroph isolated from digester sludge. *Int J Syst Evol Micr*, 63(Pt 11), 4072–4076. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.050369-0>.

50. Slobodkin, A., Reysenbach, A.-L., Mayer, F., & Wiegel, J. (1997). Isolation and Characterization of the Homoacetogenic Thermophilic Bacterium *Moorella glycerini* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 969–974. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-969>.

51. Balk, M., Weijma, J., Friedrich, M. W., & Stams, A. J. M. (2003). Methanol utilization by a novel thermophilic homoacetogenic bacterium, *Moorella mulderi* sp. nov., isolated from a bioreactor. *Archives of Microbiology*, 179(5), 315–320. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0523-x>.

52. Engle M, Li Y, Rainey F, DeBlois S, Mai V, Reichert A, Mayer F, Messner P, Wiegel J. *Thermobrachium celere* gen. nov., sp. nov., a rapidly growing thermophilic, alkalitolerant, and proteolytic obligate anaerobe. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:1025-1025. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1025>.

53. Ciranna, A., Santala, V., & Karp, M. (2011). Biohydrogen production in alkalithermophilic conditions: *Thermobrachium celere* as a case study. *Bioresource Technology*, 102(18), 8714–8722. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.028>.

54. Maune MW, Tanner RS Description of *Anaerobaculum hydrogeniformans* sp. nov., an anaerobe that produces hydrogen from glucose, and emended description of the genus *Anaerobaculum*.// *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012 Apr; 62(Pt 4):832-8. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.024349-0>.

55. Gerritsen J, Fuentes S, Grievink W, van Niftrik L, Tindall BJ, Timmerman HM, Rijkers GT, Smidt H. Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov., and *Asaccharospora* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64:1600-1616. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059543-0>.

56. Černý, M., Vítězová, M., Vítěz, T., Bartoš, M., & Kushkevych, I. (2018). Variation in the Distribution of Hydrogen Producers from the Clostridiales Order in Biogas Reactors Depending on Different Input Substrates. *Energies*, 11(12), 3270. <https://doi.org/10.3390/en11123270>.

57. Rainey, F.A. Clostridiales. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; JohnWiley & Sons, Inc.:Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 1–5.

58. Lee M, Hidaka T, Tsuno H. Two-phased hyperthermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge with kitchen garbage. *J Biosci Bioeng* 2009; 108:408-13. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.05.011>.

59. Manaia, C. M. (2003). *Tepidiphilus margaritifera* gen. nov., sp. nov., isolated from a thermophilic aerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(5), 1405–1410. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02538-0>.

60. Zhao X, Li D, Xu S, Guo Z, Zhang Y, Man L, Jiang B, Hu X. *Clostridium guangxiense* sp. nov. and *Clostridium neuense* sp. nov., two phylogenetically closely related hydrogen-producing species isolated from lake sediment// *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017. 67(3). P. 710-715. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001702>.

61. Yang, G., Wang, J. (2019). Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.039>.

62. Yang, G., Yin, Y., & Wang, J. (2019). Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.216>.

63. De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N. & Verstraete, W. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biometathation. *Bioresour. Technol*. 112, 1–9 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079>.

64. Dolfing, J. and W. G. B. M. Bloeman. (1985). Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *Journal of Microbiological Methods* 4 (1):1–12. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(85\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0167-7012(85)90002-8).



References

- 1 Kothari R., D. Buddhi, R.L. Sawhney, Comparison of environmental and economic aspects of various hydrogen production methods. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 12 (2008) 781 553-563. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.07.012>.
2. Abbasi T., Abbasi S.A. 'Renewable' hydrogen: Prospects and challenges, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15 (2011) 3034-3040. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.02.026>.
3. Khan MA, Ngo HH, Guo W, Liu Y, Zhang X, Guo J, Chang SW, Nguyen DD, Wang J, Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy, *Renewable Energy* 2018 V. 129B. Pp. 754-768. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.029>.
4. Wang JL, Yin Y. Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock. *Renew Sustain Energy Rev* 2018; 92:284-306. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0871-5>.
5. Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>.
6. Elbeshbishy E, Dhar BR, Nakhla G, Lee HS. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 2017; 79:656-68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>.
7. Wang JL, Yin YN. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2017; 42:4804e23. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.135>.
8. Wong YM, Wu TY, Juan JC. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 2014; 34:471–82. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>.
9. Li C, Fang HHP. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2007; 37:1–39. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>.
10. Valdez-Vazquez I, Ríos-Leal E, Esparza-García F, Cecchi F, Poggi-Varaldo HM. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *Int J Hydrog Energy* 2005; 30:1383–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.016>.
11. De Gioannis, G., Muntoni, A., Poletti, A., Pomi, R., 2013. A review of dark fermentation hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Manage.* 33, 1345–1361. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.02.019>.
12. Kobayashi, T., Xu, K.-Q., Li, Y.-Y., Inamori, Y., 2012. Evaluation of hydrogen and methane production from municipal solid wastes with different compositions of fat, protein, cellulosic materials and the other carbohydrates. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15711–15718. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.044>.
13. Alibardi, L., & Cossu, R. (2016). Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Management*, 47, 69–77.
14. Campuzano & González-Martínez, S. (2016). Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Management*, 54, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>.
15. Wei S Z, Xiao B Y, Liu J X. Impact of alkali and heat pretreatment on the pathway of hydrogen production from sewage sludge. *Chinese Sci Bull*, 2010, 55: 777–786, <https://doi.org/10.1007/s11434-009-0591-7>.
16. Lokshina, L., Vavilin, V., Litt, Y., Glagolev, M., Sabrekov, A., Kotsyurbenko, O., & Kozlova, M. (2019). Methane Production in a West Siberian Eutrophic Fen Is Much Higher than Carbon Dioxide Production: Incubation of Peat Samples, Stoichiometry, Stable Isotope Dynamics, Modeling. *Water Resources*, 46(S1), S110–S125. <https://doi.org/10.1134/S0097807819070133>.
17. Litt Y., Nikitina A., Kovalev D., Ermoshin A., Mahajan R., Gunjan G., Nozhevnikova A. Influence of cationic polyacrylamide flocculant on high-solids' anaerobic digestion of sewage sludge under thermophilic conditions, *Environmental Technology*. 2017. Dec 14:1-26 <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1417492>.
18. Conrad, R. Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal. *Org. Geochem.* 36, 739–752 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.09.006>.
19. Lever M.A., Torti A., Eickenbusch P., Michaud A.B., Šantl-Temkiv T., Jørgensen B.B. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types // *Front Microbiol.* 2015. V. 6. P. 476. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00476>.
20. 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. 6. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>.
21. Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S.M., Betley J., Fraser L., Bauer M., Gormley N., Gilbert J.A., Smith G., Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms // *ISME J.* 2012. V. 6(8). P. 1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.
22. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods*. 2010 V. 7. P. 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.

23. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
24. Liu I.C., Whang L.-M., Ren W.-J., Lin P.-Y. The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations, *Int. J. Hydrogen Energ.* 36 (2011) 439-449 <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.10.045>.
25. Bundhoo M.A.Z., Mohee R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review, *Int. J. Hydrogen Energ.* 41 (2016) 6713-6733. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>.
26. Carrillo-Reyes J, Buitrón G, Moreno-Andrade I, Tapia-Rodríguez AC, Palomo-Briones R, Razo-Flores E, Juárez OA, Arreola-Vargas J, Bernet N, Braga AFM, Braga L, Castelló E, Chatellard L, Etchebehere C, Fuentes L, León-Becerril E, Méndez-Acosta HO, Ruiz-Filippi G, Venegas ET, Trably E, Wenzel J, Zaiat M, Standardized protocol for determination of biohydrogen potential, *MethodsX* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.027>.
27. Goud, R.K., Venkata Mohan, S., 2012. Acidic and alkaline shock pretreatment to enrich acidogenic biohydrogen producing mixed culture: Long term synergistic evaluation of microbial inventory, dehydrogenase activity and bioelectro kinetics. *RSC Adv.* 2, 6336–6353. <https://doi.org/10.1039/C2RA20526B>.
28. Calusinska, M., Happe, T., Joris, B., Wilmutte, A., 2010. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: A comparative genomic perspective. *Microbiology* 156, 1575–1588. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032771-0>.
29. Meyer, J., 2007. (FeFe) hydrogenases and their evolution: A genomic perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (9), 1063–1084. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6477-4>.
30. Laothanachareon T, Kanchanasuta S, Mhuanthong W, Phalakornkule C, Pisutpaisal N, Champreda V. Analysis of microbial community adaptation in mesophilic hydrogen fermentation from food waste by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *J Environ Manag* 2014; 144:143-51. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.019>.
31. Jumas-Bilak, E.; Roudiere, L.; Marchandin, H. (2009). "Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family Syntrophomonadaceae, phylum 'Firmicutes'". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1028–1035. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.006718-0>.
32. Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., and Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME. J.* 3, 700–714. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.2>.
33. Dahle H, Birkeland N-K (2006) *Thermovirga lienii* gen. Nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a North Sea oil well. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1539–1545. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63894-0>.
34. Honda T, Fujita T, Tonouchi A (2013) *Aminivibrio pyruvatiphilus* gen. Nov., sp. nov., an anaerobic, amino-acid-degrading bacterium from soil of a Japanese rice field. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 3679–3686. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.052225-0>.
35. Meng X, Yuan X, Ren J, Wang X, Zhu W, Cui Z (2017) Methane production and characteristics of the microbial community in a two stage fixed-bed anaerobic reactor using molasses. *Bioresour Technol* 241:1050–1059. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.181>.
36. Yi, Y., Wang, H., Chen, Y., Gou, M., Xia, Z., Hu, B., ... Tang, Y. Identification of Novel Butyrate- and Acetate-Oxidizing Bacteria in Butyrate-Fed Mesophilic Anaerobic Chemostats by DNA-Based Stable Isotope Probing. *Microb Ecol* 79, 285–298 (2020) <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01400-z>.
37. Bernard M. Ollivier, Robert A. Mah, Thomas J. Ferguson, David R. Boone, J.L. Garcia, and Ralph Robinson. Emendation of the Genus *Thermobacteroides*: *Thermobacteroides proteolyticus* sp. nov., a Proteolytic Acetogen from a Methanogenic Enrichment. *International Journal of Systematic Bacteriology*. October 1985 vol. 35 no. 4 425-428 <https://doi.org/10.1099/00207713-35-4-425>.
38. Etchebehere, C; Pavan, M. E.; Zorzopulos, J.; Soubes, M.; Muxi, L. (1998). "Coprothermobacter platensis sp. nov., a new anaerobic proteolytic thermophilic bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 48 (4): 1297–1304. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1297>.
39. Sasaki K, Morita M, Sasaki D, Nagaoka J, Matsumoto N et al. Syntrophic degradation of proteinaceous materials by the thermophilic strains *Coprothermobacter proteolyticus* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *J Biosci Bioeng* 2011; 112:469–472. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.07.003>.
40. Sivarajan, A., Shanmugasundaram, T., Thirumalairaj, J., & Balagurunathan, R. (2016). Production and optimization of biohydrogen from saccharolytic actinobacterium, *Streptomyces rubiginosus* (SM16), using sugarcane molasses. *Biofuels*, 8(6), 717–723. <https://doi.org/10.1080/17597269.2016.1257317>.
41. Ntaikou, I., Gavala, H. N., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008). Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1153–1163. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.10.053>.
42. Sheng T, Gao L, Zhao L, Liu W, Wang A. Direct hydrogen production from lignocellulose by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain DD32. *RSC Adv.* 2015; 5:99781–8. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0692-y>.
43. Cao G, Ren N, Wang A, Lee D-J, Guo W, Liu B, et al. Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Int J Hydrogen Energy*.

2009; 34:7182–8.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.009>.

44. Mamimin C, Jehlee A, Saelor S, Prasertsan P, Sompong O. Thermophilic hydrogen production from co-fermentation of palm oil mill effluent and decanter cake by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *Int J Hydrogen Energy*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.152>.

45. Zhao Lei, Chen Chuan, Ren Hong-Yu, Wang Zi-Han, Wu Kai-Kai, Meng Jia, Cao Guang-Li, Ren Nan-Qi, Ho Shih-Hsin Unraveling hydrogen production potential by glucose and xylose co-fermentation of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 and its metabolisms through transcriptomic sequencing // *Int. J. Energy Res.* 2020. <https://doi.org/10.1002/er.5468>.

46. Qin, Y., Li, L., Wu, J., Xiao, B., Hojo, T., Kubota, K., ... Li, Y.-Y. (2019). Co-production of biohydrogen and biomethane from food waste and paper waste via recirculated two-phase anaerobic digestion process: Bioenergy yields and metabolic distribution. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.004>.

47. Sinha, P., & Pandey, A. (2014). Biohydrogen production from various feedstocks by *Bacillus firmus* NMBL-03. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(14), 7518–7525.

48. Shah, A. T., Favaro, L., Alibardi, L., Cagnin, L., Sandon, A., Cossu, R., ... Basaglia, M. (2016). *Bacillus* sp. strains to produce bio-hydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. *Applied Energy*, 176, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.05.054>

49. Alves, J. I., van Gelder, A. H., Alves, M. M., Sousa, D. Z., & Plugge, C. M. (2013). *Moorella stamsii* sp. nov., a new anaerobic thermophilic hydrogenogenic carboxydrotroph isolated from digester sludge. *Int J Syst Evol Micr*, 63(Pt 11), 4072–4076. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.050369-0>.

50. Slobodkin, A., Reysenbach, A.-L., Mayer, F., & Wiegel, J. (1997). Isolation and Characterization of the Homoacetogenic Thermophilic Bacterium *Moorella glycerini* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 969–974. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-969>.

51. Balk, M., Weijma, J., Friedrich, M. W., & Stams, A. J. M. (2003). Methanol utilization by a novel thermophilic homoacetogenic bacterium, *Moorella mulderi* sp. nov., isolated from a bioreactor. *Archives of Microbiology*, 179(5), 315–320. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0523-x>.

52. Engle M, Li Y, Rainey F, DeBlois S, Mai V, Reichert A, Mayer F, Messner P, Wiegel J. *Thermobrachium celere* gen. nov., sp. nov., a rapidly growing thermophilic, alkalitolerant, and proteolytic obligate anaerobe. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:1025-1025. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1025>.

53. Ciranna, A., Santala, V., & Karp, M. (2011). Biohydrogen production in alkalithermophilic conditions: *Thermobrachium celere* as a case study. *Bioresource Technology*, 102(18), 8714–8722. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.028>.

54. Maune MW, Tanner RS Description of *Anaerobaculum hydrogeniformans* sp. nov., an anaerobe that produces hydrogen from glucose, and emended description of the genus *Anaerobaculum*.// *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012 Apr; 62(Pt 4):832-8. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.024349-0>.

55. Gerritsen J, Fuentes S, Grievink W, van Niftrik L, Tindall BJ, Timmerman HM, Rijkers GT, Smidt H. Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64:1600-1616. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.059543-0>.

56. Černý, M., Vítězová, M., Vítěz, T., Bartoš, M., & Kushkevych, I. (2018). Variation in the Distribution of Hydrogen Producers from the Clostridiales Order in Biogas Reactors Depending on Different Input Substrates. *Energies*, 11(12), 3270. <https://doi.org/10.3390/en11123270>.

57. Rainey, F.A. Clostridiales. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 1–5.

58. Lee M, Hidaka T, Tsuno H. Two-phased hyperthermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge with kitchen garbage. *J Biosci Bioeng* 2009; 108:408-13. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.05.011>.

59. Manaia, C. M. (2003). *Tepidiphilus margaritifer* gen. nov., sp. nov., isolated from a thermophilic aerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(5), 1405–1410. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02538-0>.

60. Zhao X, Li D, Xu S, Guo Z, Zhang Y, Man L, Jiang B, Hu X. *Clostridium guangxiense* sp. nov. and *Clostridium neuense* sp. nov., two phylogenetically closely related hydrogen-producing species isolated from lake sediment// *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017. 67(3). P. 710-715. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001702>.

61. Yang, G., Wang, J. (2019). Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.039>.

62. Yang, G., Yin, Y., & Wang, J. (2019). Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.216>.

63. De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N. & Verstraete, W. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresour. Technol*. 112, 1–9 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079>.

64. Dolfing, J. and W. G. B. M. Bloeman. (1985). Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *Journal of Microbiological Methods* 4 (1):1–12. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(85\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0167-7012(85)90002-8).

Транслитерация по BSI

