

УДК 579

Динамика развития метаногенного сообщества в процессе анаэробной утилизации отходов агропромышленного комплекса

А. М. Зиганшин^{1*}, Э. Э. Зиганшина¹, С. Кляйнштаубер², Ю. Протер³, О. Н. Ильинская¹¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань,

ул. Кремлевская, 18, Россия

²Институт им. Гельмгольца по исследованию окружающей среды, 04318, Лейпциг,

Permoser str. 15, Германия

³Немецкий центр исследования биомассы, 04347, Лейпциг, Torgauer str. 116, Германия

*E-mail: a.ziganshin06@fulbrightmail.org

Поступила в редакцию 08.08.2012

РЕФЕРАТ С использованием анализа полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов архейных генов 16S рРНК (Т-RFLP-анализа) изучены метаногенные археи, участвующие в анаэробном разложении навоза крупного рогатого скота и соломы кукурузы. Оценены биологическое разнообразие и динамика развития метаногенных сообществ, участвующих в анаэробной деструкции органических отходов агропромышленного комплекса с образованием биогаза в лабораторных установках. Т-RFLP-анализ в сочетании с созданием библиотек клонов архейных генов 16S рРНК показал, что метаногенный консорциум в основном состоял из представителей родов *Methanosarcina* и *Methanoculleus* с доминированием *Methanosarcina* spp. на протяжении всего эксперимента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА архейные гены 16S рРНК, Т-RFLP-анализ, продукция биогаза, метаногены.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Т-RFLP-анализ – анализ полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов; ОТЕ – операционная таксономическая единица; КРС – крупный рогатый скот; оСВ – органическое сухое вещество.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из эффективных методов, ведущих к снижению отрицательного влияния отходов сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности на окружающую среду, является их обработка в анаэробных условиях. Анаэробная переработка отходов сопровождается деструкцией значительной части органических компонентов и продукцией возобновляемого источника энергии – биогаза, состоящего из метана (50–75%) и углекислого газа (25–50%) с незначительными примесями. В отличие от биоэтанола и биодизеля, производимых в основном из энергетических сортов растений, биогаз получают при утилизации остаточной биомассы и различных органических отходов [1–7]. К таким отходам относится, в частности, навоз крупного рогатого скота (КРС). Однако из-за низкой биоразлагаемости утилизация навоза в анаэробных реакторах отличается незначительным выходом биогаза. Совместная анаэробная утилизация навоза и растительной биомассы способствует ускорению гидролиза субстрата и оптимизации распределения питательных веществ в биореак-

торе, что активизирует рост микроорганизмов и выход биометана [8, 9]. В последние годы одновременная биодegradация нескольких различных субстратов интенсивно изучается [9–13].

Первые три стадии анаэробной деструкции комплексного субстрата – гидролиз, ацидогенез и ацетогенез – ведут бактериальные сообщества, четвертую стадию осуществляет группа ацетокластических и гидрогенотрофных метаногенов, которые поглощают ацетат, молекулярный водород, углекислый газ и выделяют метан [1, 6, 14]. Независимо от режима сбраживания (психро-, мезо- или термофильного), а также состава субстрата доминирующими участниками метаногенеза являются представители *Methanomicrobiales* и/или *Methanosarcinales* [2, 5, 7, 15–18]. Однако данные об изменениях структуры микробных ассоциаций в ходе метаногенной ферментации весьма скудны.

Настоящая работа посвящена изучению путей утилизации отходов сельского хозяйства – навоза и кукурузной соломы – с образованием биогаза в лабораторных биогазовых реакторах, а также исследо-

ванию разнообразия, структуры и динамики метаногенных сообществ, участвующих в данном процессе, с применением современных методов молекулярной биологии. Определение состава и динамики микробных сообществ биогазовых реакторов совместно с анализом деструкции субстрата направлено на выявление возможностей интенсификации анаэробного процесса. Использование универсального филогенетического маркера 16S рРНК, функциональных генов-маркеров и T-RFLP-анализа (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, или полиморфизм длин концевых рестрикционных фрагментов) [19, 20] внесет вклад в установление состава и временных изменений микробного консорциума.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Параметры биореакторов

В табл. 1 представлены основные технологические параметры анаэробной переработки навоза КРС и соломы кукурузы. Во всех биореакторах поддерживали мезофильный режим (38°C). В качестве субстрата для биореакторов R 4.13 и R 4.14 использовали навоз КРС и солому кукурузы, тогда как для биореакторов R 4.15 и R 4.16 – навоз КРС и экструдированную солому кукурузы. Внесение новой порции субстрата и выгрузку переработанной смеси проводили ежедневно; количество перерабатываемого субстрата поддерживали на уровне 30 л; время пребывания субстрата в реакторах составляло 35 сут. Выход биогаза, его состав и pH измеряли каждый день, тогда как концентрацию органических кислот и ионов аммония – 2 раза в неделю.

Аналитические методы

Производство биогаза измеряли с использованием барабанного газового счетчика RitterTG 05 («Vochum», Германия); состав биогаза определяли с использованием инфракрасного газового анализатора GA 94 («Ansyco», Германия). Концентрацию ионов аммония определяли после окрашивания жидкой фазы содержимого биореакторов реагентом Несслера, образцы далее анализировали с использованием спектрофотометра DR/2000 («HachCompany», США) при 425 нм. Общую концентрацию органических кислот измеряли титрованием 0.025–0.1 М раствором серной кислоты в диапазоне pH от 4.5 до 3.5 с помощью титратора TitrationExcellence T 90 («Mettler-Toledo», Швейцария). Летучие органические кислоты анализировали на газовом хроматографе 5890 series IIGC («Hewlett Packard», США), оснащенном автоматическим пробоотборником HS40 («Perkin Elmer», США) и колонкой Agilent HP-FFAP (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм), в соответствии с нашей прежней работой [7].

Экстракция и очистка суммарной ДНК

Образцы из четырех реакторов отбирали раз в месяц и сразу же использовали для экстракции и очистки ДНК. Биомассу переработанной смеси осаждали центрифугированием при 20000 g в течение 10 мин. Далее суммарную ДНК экстрагировали и очищали с использованием FastDNASPIN Kit for soil («Qbiogene», Германия) согласно инструкции производителя. Общее количество выделенной и очищенной ДНК оценивали с использованием УФ-видимого спектрофотометра NanoDrop ND-1000 («PecLab», Германия).

Аmplификация, клонирование и секвенирование генов 16S рРНК архей

Все молекулярные манипуляции были проведены согласно нашей ранней публикации [7]. Гены 16S рРНК архей амплифицировали с помощью ПЦП с суммарной ДНК в термоциклере DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler («Bio-Rad»), используя комбинацию универсальных праймеров UniArc21F (5'-ТТСΥGКТТGATCCYGSCRG-3') и UniArc931R (5'-CCCGCCAATTCCTTTNAG-3') и 2 × TaqMasterMix («Qiagen», Германия). Состав реакционной смеси: 6 мкл 2 × TaqMasterMix, 0.5 мкл UniArc21F (5 пмоль/мкл), 0.5 мкл UniArc931R (5 пмоль/мкл), 4 мкл H₂O и 1 мкл в 100 раз разбавленной ДНК (эквивалентно 1–3 нг). Реакцию амплификации начинали с денатурации при 95°C в течение 5 мин, затем проводили 35 циклов: денатурация при 94°C в течение 1 мин, отжиг при 54°C в течение 1 мин и элонгация при 72°C в течение 2 мин. Конечную элонгацию проводили при 72°C в течение 20 мин.

ПЦП-продукты очищали с использованием QIAGEN PCR Purification Kit и клонировали с использованием QIAGEN PCR Cloning Kit («QIAGEN», Германия). После клонирования генов 16S рРНК архей проанализировали наличие вставки нужного размера в позитивных клонах с использованием вектор-специфичных праймеров M13uni(-21) (5'-TGTAААACGACGCCAGT-3') и M13rev(-29) (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'). Далее M13-ампликоны в количестве 1 мкл обрабатывали эндонуклеазой HaeIII («New England Biolabs», Германия) и разделяли электрофоретически в гелях Phor-агарозы («Biozym», Германия). Длины рестрикционных фрагментов анализировали при помощи программ Phoretix™ 1D Database Version 2.00 и Phoretix™ 1D Advanced Version 5.20 («Nonlinear Dynamics», Великобритания), клоны объединяли в кластеры и строили дендограммы. Репрезентативные клоны из больших кластеров отбирали для последующего определения их нуклеотидных последовательностей.

Таблица 1. Основные технологические параметры анаэробной переработки навоза КРС и кукурузной соломы

| Реактор* | Нагрузка по органике**, Г _{осв} сут ⁻¹ | Состав субстрата, г сут ⁻¹ | | | Выход био- газа при н.у., л Г ⁻¹ _{осв} | Состав биогаза | | | рН | Органи- ческие кислоты, г л ⁻¹ | NH ₄ ⁺ -N, г л ⁻¹ |
|----------|---|---------------------------------------|--------|----------|--|------------------------|------------------------|---------------------------|------|--|---|
| | | навоз КРС | солома | сумма*** | | CH ₄ , % | CO ₂ , % | H ₂ S, м.д. | | | |
| R 4.13 | 74.1 | 723.6 | 28.2 | 857 | 0.40 | 58.7 | 40.2 | 3450 | 7.63 | 1.49 | 1.20 |
| | 71.2 | 518.7 | 26.3 | 857 | 0.36 | 59.8 | 38.7 | 2216 | 7.50 | 1.90 | 1.24 |
| | 71.7 | 694.6 | 26.3 | 857 | 0.33 | 55.6 | 42.9 | 2145 | 7.61 | 1.80 | 1.16 |
| R 4.14 | 74.1 | 723.6 | 28.2 | 857 | 0.40 | 59.3 | 39.8 | 4183 | 7.66 | 1.42 | 1.22 |
| | 71.2 | 518.7 | 26.3 | 857 | 0.38 | 58.4 | 40.2 | 1928 | 7.53 | 1.66 | 1.28 |
| | 71.7 | 694.6 | 26.3 | 857 | 0.37 | 56.7 | 42.1 | 2092 | 7.58 | 1.43 | 1.31 |
| R 4.15 | 72.1 | 723.6 | 83.7 | 857 | 0.39 | 58.1 | 41.1 | ~5000 | 7.75 | 1.54 | 1.47 |
| | 68.6 | 518.7 | 78.1 | 857 | 0.39 | 59.3 | 39.2 | 2234 | 7.56 | 1.28 | 1.39 |
| | 69.1 | 694.6 | 78.1 | 857 | 0.39 | 56.8 | 42.6 | 2373 | 7.74 | 1.37 | 1.26 |
| R 4.16 | 72.1 | 723.6 | 83.7 | 857 | 0.41 | 58.6 | 40.6 | 4558 | 7.76 | 1.51 | 1.54 |
| | 68.6 | 518.7 | 78.1 | 857 | 0.38 | 59.0 | 40.1 | 2056 | 7.54 | 1.53 | 1.36 |
| | 69.1 | 694.6 | 78.1 | 857 | 0.39 | 57.2 | 41.5 | 3155 | 7.61 | 1.37 | 1.27 |

* Параметры биореакторов представлены в трех точках отбора проб, когда метаногенные сообщества были проанализированы (за исключением выхода биогаза, состава биогаза и рН, данные которых представлены как средние значения за 1 нед.).

** Органическое сухое вещество.

*** Вода добавлена до конечной концентрации 857 мл сут⁻¹.

ПЦР-продукты репрезентативных клонов очищали с использованием Promega PCR Purification Kit («Promega», США). Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК определяли с применением набора реактивов BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1.1 на автоматическом секвенаторе ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). В качестве разделительной матрицы использовали полимер POP-6™. Программу BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [21] далее применяли для поиска сходных нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank. Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>) [22] использовали для определения таксономической принадлежности микроорганизмов.

T-RFLP-анализ

T-RFLP-анализ проводили в соответствии с нашей предыдущей работой [7]. С этой целью гены

16S рРНК архей амплифицировали с использованием пары универсальных праймеров UniArc21F-FAM и UniArc931R и 2 × TaqMasterMix («Qiagen», Германия). Параметры ПЦР-реакции указаны выше. UniArc21F-FAM (прямой праймер) помечен флуорофором FAM (phosphoramidite fluorochrome-5-carboxyfluorescein) на 5'-конце. Ампликоны архейных генов 16S рРНК, содержащие флуорофор FAM, очищали с использованием набора SureCleanPlus («Bio-line», Германия), далее обрабатывали рестриктазами MseI и HaeIII («New England Biolabs», Германия). После 16-часовой инкубации при 37°C фрагменты ДНК осаждали 3 М ацетатом натрия (рН 5.5) и абсолютным этанолом. После удаления супернатанта осадок высушивали в вакууме и подсушенные фрагменты ДНК ресуспендировали в растворе, содержащем 10 мкл Hi-Di-формамида и 0.25 мкл GeneScan™ – 500 ROX™STANDARD или MapMarker® 1000 (наборы стандартов определенного размера). Пробы де-

Таблица 2. Результаты секвенирования клонированных генов 16S рРНК архей и экспериментально полученные концевые рестрикционные фрагменты (T-RF)

| Клон, п.н. | Ближайший представитель (номер в базе данных GenBank) / процент совпадения | Таксономическая принадлежность в соответствии с RDP 10 | MseI-T-RF, п.н. | HaeIII-T-RF, п.н. |
|--------------|--|--|-----------------|-------------------|
| ar_B9 (863) | Uncultured archaeon clone: FA69 (AB494258) / 99% | <i>Methanoculleus</i> sp. | 37 | 67 |
| ar_A1 (864) | Uncultured <i>Methanoculleus</i> sp. clone: DMMR219 (HM218939) / 99% | <i>Methanoculleus</i> sp. | 36 | 67 |
| ОТЕ 1 | | <i>Methanoculleus</i> sp. I | 36/37 | 67 |
| ar_A2 (863) | Uncultured archaeon clone: MTSArc_G8 (EU591664) / 99% | <i>Methanoculleus</i> sp. | 499 | 67 |
| ОТЕ 2 | | <i>Methanoculleus</i> sp. II | 499 | 67 |
| ar_E12 (864) | Uncultured archaeon clone: WA50 (AB494245) / 100% | <i>Methanocorpusculum</i> sp. | 97 | 241 |
| ОТЕ 3 | | <i>Methanocorpusculum</i> sp. | 97 | 241 |
| ar_E10 (567) | Uncultured euryarchaeote clone: B35_F_A_A05 (EF552199) / 99% | <i>Methanosarcina</i> sp. | 557 | 220 |
| ar_H2 (873) | Uncultured euryarchaeote clone: B35_F_A_A05 (EF552199) / 99% | <i>Methanosarcina</i> sp. | 557 | 220 |
| ОТЕ 4 | | <i>Methanosarcina</i> sp. I | 557 | 220 |
| ar_E6 (873) | Uncultured archaeon clone: SA42 (AB494252) / 99% | <i>Methanosarcina</i> sp. | 859 | 220 |
| ar_F10 (873) | Uncultured archaeon clone: SA42 (AB494252) / 99% | <i>Methanosarcina</i> sp. | 858 | 220 |
| ОТЕ5 | | <i>Methanosarcina</i> sp. II | 858/859 | 220 |
| ar_G8 (874) | Uncultured archaeon clone: SA42 (AB494252) / 99% | <i>Methanosarcina</i> sp. | 877 | 220 |
| ОТЕ6 | | <i>Methanosarcina</i> sp. III | 877 | 220 |

натурировали при 95°C в течение 5 мин, охлаждали на льду (примерно 5 мин) и анализировали на генетическом анализаторе ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). В качестве разделительной матрицы использовали полимер POP-6™. Полученные T-RFLP-граммы анализировали при помощи программы GeneMapper Version 3.7 («Applied Biosystems»). Теоретические T-RF-значения репрезентативных фило типов, представленных в библиотеке клонов, были оценены программой NEBcutter Version 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) и подтверждены экспериментально T-RFLP-анализом соответствующих клонов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование альтернативных возобновляемых источников энергии, в частности различных видов органических отходов, является необходимой составляю-

щей «зеленых технологий» производства биотоплива [1]. В настоящей работе с целью анализа динамики развития метаногенных ассоциаций проведена анаэробная конверсия навоза и соломы кукурузы в модельных мезофильных биореакторах.

В табл. 1 представлены основные технологические параметры анаэробного разложения органических субстратов сельского хозяйства. Анаэробную деструкцию биомассы проводили в четырех лабораторных ферментерах с рабочей емкостью 30 л при 38°C. В реакторах R 4.13 и R 4.14 проводили совместную ферментацию следующих субстратов – навоза КРС и соломы кукурузы, а в реакторах R 4.15 и R 4.16 анаэробному разложению подвергали навоз и экструдированную солому кукурузы. Нагрузка по органике для реакторов R 4.13 и R 4.14 варьировала в диапазоне 71.2–74.1 г_{о.с.в.} сут⁻¹ (органическое сухое вещество), в то время как для реакторов R 4.15

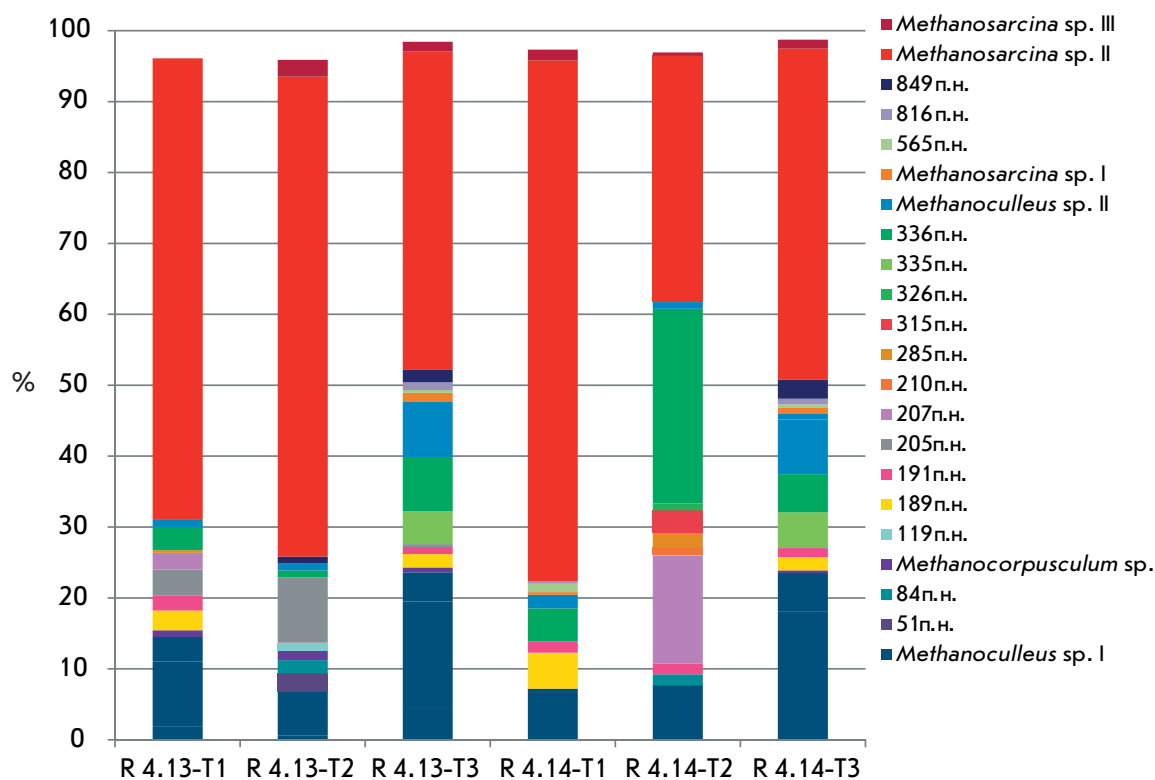


Рис. 1. Динамика развития метаногенного сообщества в ферментерах R 4.13 и R 4.14 на основе T-RFLP-анализа (после обработки ампликонов генов 16S рРНК ферментом MseI)

и R 4.16 общая нагрузка по органике была ниже и составила 68.6–72.1 г_{оСВ} сут⁻¹. На протяжении всего эксперимента время пребывания субстрата в реакторах составляло 35 дней. В зависимости от вносимого органического вещества выход биогаза из анализируемых ферментеров варьировал в диапазоне от 0.33 до 0.41 л г⁻¹_{оСВ} с содержанием метана 56–60%. Как видно из табл. 1, во всех биореакторах значения рН поддерживали на уровне ~7.5–7.8, количество органических кислот – в диапазоне ~1.3–1.9 г л⁻¹, а концентрацию ионов аммония – в пределах ~1.2–1.5 г л⁻¹. Эти параметры благоприятны для процесса метаногенеза [23].

С помощью амплификации, клонирования, рестрикционных анализов и секвенирования генов 16S рРНК архей, полученных из суммарной ДНК содержимого биореакторов, проведена оценка биологического разнообразия и динамики метаногенных сообществ, участвующих в анаэробной деструкции органических отходов агропромышленного комплекса – навоза КРС и соломы кукурузы. Определение структуры метаногенной ассоциации осуществляли в трех точках отбора проб с интервалом отбора 1 мес.

Амплификация, клонирование, секвенирование генов 16S рРНК, а также T-RFLP-анализ выявили относительно большое разнообразие представителей

архей в реакторах. При проведении T-RFLP-анализа ампликоны генов 16S рРНК архей, содержащие флуорофор FAM, обрабатывали эндонуклеазами MseI и HaeIII. Принадлежность пиков на общей T-RFLP-грамме к определенным филогенетическим группам микроорганизмов определяли по длине соответствующих концевых рестрикционных фрагментов (T-RF) генов 16S рРНК клонов. В общей сложности из клонотеки были отобраны девять клонов для определения их нуклеотидных последовательностей. Эти клоны были сгруппированы в шесть операционных таксономических единиц (ОТЕ) на основе длин T-RF (табл. 2). При определении таксономической принадлежности три филопита отнесли к порядку Methanomicrobiales (ОТЕ 1, ОТЕ 2, ОТЕ 3) и три – к порядку Methanosarcinales (ОТЕ 4, ОТЕ 5, ОТЕ 6). С помощью T-RFLP-анализа генов 16S рРНК с использованием рестриктазы MseI в ферментерах выявлено до 22 различных T-RF-профилей (с встречаемостью более 1%). Поскольку основные T-RF в реакторах были идентифицированы, мы определили метаногены, играющие ключевую роль в продукции биогаза (табл. 2).

На рис. 1 представлено распределение групп метаногенов (динамика развития сообщества) в ходе анаэробной деструкции навоза и соломы (R 4.13 и R 4.14). Это распределение получено на основе про-

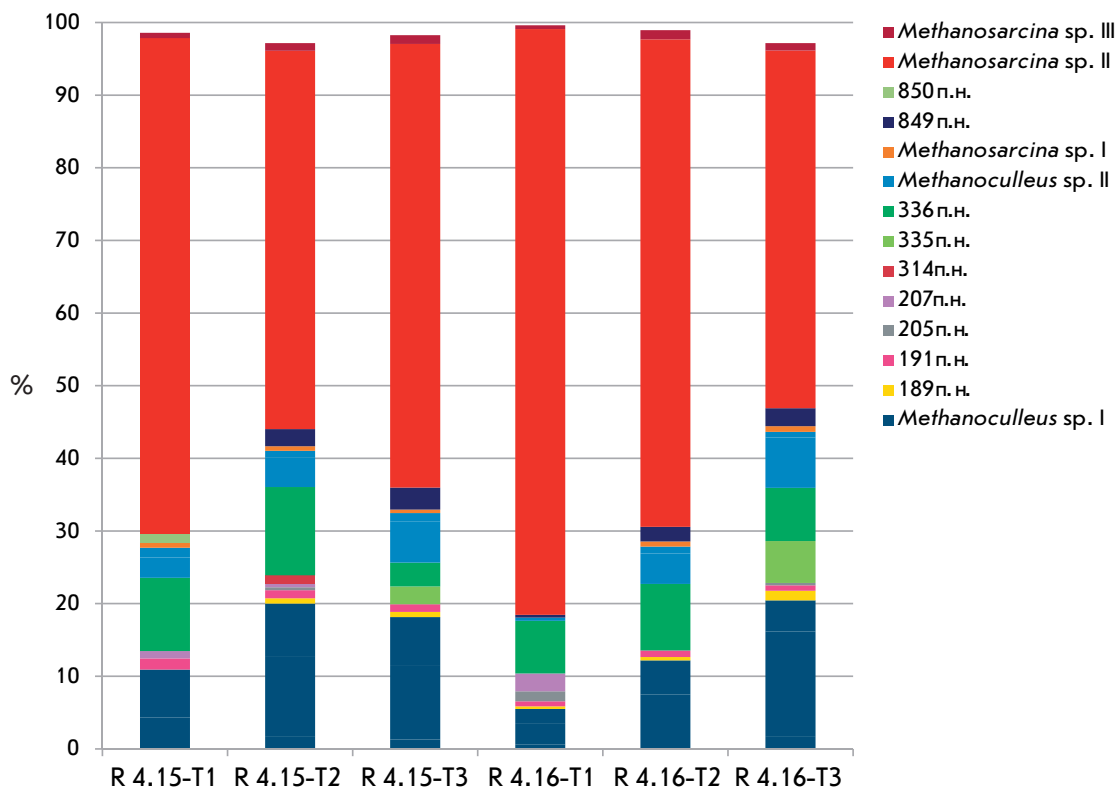


Рис. 2. Динамика развития метаногенного сообщества в ферментерах R 4.15 и R 4.16 на основе T-RFLP-анализа (после обработки ампликонов генов 16S рРНК ферментом MseI)

филей MseI-рестрикции (результаты, полученные при использовании фермента HaeIII, не показаны). В первой отобранной пробе, когда нагрузка по органике составила $74.1 \text{ г}_{\text{оСВ}} \text{ сут}^{-1}$, T-RFLP-анализ позволил выявить преобладание метаногенов рода *Methanosarcina* и гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanoculleus* в архейном сообществе биореакторов R 4.13 и R 4.14. Так, общее соотношение представителей *Methanosarcina* sp. (ОТЕ 4, ОТЕ 5, ОТЕ 6) и *Methanoculleus* sp. (ОТЕ 1, ОТЕ 2) в реакторе R 4.13 составило 65 и 15% от общих T-RF-площадей пиков соответственно. В реакторе R 4.14 были идентифицированы метаногены *Methanosarcina* sp. и *Methanoculleus* sp. – 75 и 9% соответственно. Другие представители архей с низкой встречаемостью (1–3%) были отнесены к минорным группам сообщества (рис. 1). Снижение вносимой органики до $71.2 \text{ г}_{\text{оСВ}} \text{ сут}^{-1}$ и последующее ее увеличение до $71.7 \text{ г}_{\text{оСВ}} \text{ сут}^{-1}$ привело к изменению состава микробного сообщества. Так, относительная частота встречаемости представителей рода *Methanosarcina* (ОТЕ 4, ОТЕ 5, ОТЕ 6) в двух следующих точках отбора проб составила 70/47 и 35/49% для R 4.13 и R 4.14 соответственно. Относительная частота встречаемости видов *Methanoculleus* (ОТЕ 1, ОТЕ 2) в R 4.13 и R 4.14 составила 8/31 и 9/32% соответственно (две следующие точки отбора проб). Среди минорных ассоциаций обнаружены

и представители гидрогенотрофных метаногенов, относящихся к роду *Methanocorpusculum*, однако на их долю приходилось менее 2% от общей площади T-RF-пиков. Кроме того, на T-RFLP-граммах обнаружен мажорный пик, соответствующий фрагменту длиной 336 п.н.; однако этого фило типа не было среди клонированных генов 16S рРНК архей и, следовательно, он был отнесен к неидентифицированной группе метаногенного сообщества.

Как видно из рис. 2, структура метаногенных ассоциаций биореакторов R 4.15 и R 4.16, утилизирующих навоз и экструдированную солому, также была представлена сходными группами, обнаруженными в R 4.13 и R 4.14. Нагрузка по органике в трех точках отбора проб для R 4.15 и R 4.16 составила 72.1, 68.6 и 69.1 $\text{г}_{\text{оСВ}} \text{ сут}^{-1}$ соответственно. Преобладающими в сообществе ферментера R 4.15 стали представители рода *Methanosarcina* (70, 54 и 63% встречаемости в трех точках отбора проб соответственно) и рода *Methanoculleus* (15, 25 и 25% встречаемости в трех точках отбора проб соответственно). Как и в реакторе R 4.15, основными таксонами биореактора R 4.16 были представители рода *Methanosarcina* (81, 69 и 51%), а также представители рода *Methanoculleus* (6, 17 и 28%). Как и в реакторах R 4.13 и R 4.14, отмечена высокая встречаемость T-RF-пика размером 336 п.н., однако таксономическая группа архей, соот-

ветствующая данному фрагменту рестрикционного профиля, не определена.

Полученные результаты обосновывают возможность эффективной совместной утилизации навоза и соломы кукурузы с получением биогаза. Нами установлено, что доминирующими представителями метаногенов на протяжении всего ферментационного процесса являются представители родов *Methanosarcina* и *Methanoculleus*. Кроме этого, впервые отслежена динамика метаногенного сообщества в ходе утилизации органических отходов. Микроорганизмы *Methanoculleus* sp. используют водород и диоксид углерода для роста и продуцируют метан [2], тогда как метаногены рода *Methanosarcina* в основном рас-

щепляют ацетат с образованием метана и диоксид углерода либо утилизируют водород, диоксид углерода и метилированные соединения с образованием метана [24]. По-видимому, повышенная концентрация органических кислот в реакторах подавляет представителей строго ацетокластического рода *Methanosaeta* и стимулирует развитие *Methanosarcina* spp. [14, 25]. ●

Работа поддержана грантом Правительства Республики Татарстан «Алгарьш» (2010 г.) и стипендией совместной программы DAAD и Министерства образования и науки РФ (Программа «Михаил Ломоносов II», 2011 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Antoni D., Zverlov V.V., Schwarz W.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 77. P. 23–35.
- Krause L., Diaz N.N., Edwards R.A., Gartemann K.H., Krömeke H., Neuweiger H., Pühler A., Runte K.J., Schlüter A., Stoye J., et al. // J. Biotechnol. 2008. V. 136. P. 91–101.
- Ahn H.K., Smith M.C., Kondrad S.L., White J.W. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. V. 160. P. 965–975.
- Bedoya I.D., Arrieta A.A., Cadavid F.J. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 6624–6629.
- Goberna M., Insam H., Franke-Whittle I.H. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 2566–2572.
- Weiland P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85. P. 849–860.
- Ziganshin A.M., Schmidt T., Scholwin F., Il'inskaya O.N., Harms H., Kleinstüber S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 89. P. 2039–2052.
- Holm-Nielsen J.B., Seadi T.A., Oleskowicz-Popiel P. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 5478–5484.
- El-Mashad H.M., Zhang R. // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. P. 4021–4028.
- Gomez X., Moran A., Cuetos M.J., Sanchez M.E. // J. Power Sources. 2006. V. 157. P. 727–732.
- Davidsson A., Löfstedt C., la Cour Jansen J., Gruvberger C., Aspegren H. // Waste Manage. 2008. V. 28. P. 986–992.
- Fountoulakis M.S., Petousi I., Manios T. // Waste Manage. 2010. V. 10. P. 1849–1853.
- Nayono S.E., Gallert C., Winter J. // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. P. 6998–7004.
- Demirel B., Scherer P. // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2008. V. 7. P. 173–190.
- O'Reilly J., Lee C., Collins G., Chinalia F., Mahony T., O'Flaherty V. // Water Res. 2009. V. 43. P. 3365–3374.
- Kröber M., Bekel T., Diaz N.N., Goesmann A., Jaenicke S., Krause L., Miller D., Runte K.J., Viehöver P., Pühler A., Schlüter A. // J. Biotechnol. 2009. V. 142. P. 38–49.
- Lee C., Kim J., Hwang K., O'Flaherty V., Hwang S. // Water Res. 2009. V. 43. P. 157–165.
- Nettmann E., Bergmann I., Pramschüfer S., Mundt K., Plogsties V., Herrmann C., Klocke M. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 2540–2548.
- Abdo Z., Schüette U.M., Bent S.J., Williams C.J., Forney L.J., Joyce P. // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. P. 929–938.
- Culman S.W., Bukowski R., Gauch H.G., Cadillo-Quiroz H., Buckley D.H. // BMC Bioinformatics. 2009. V. 10. P. 171–180.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 5261–5267.
- Gerardi M.H. The microbiology of anaerobic digesters. Hoboken: Wiley-Interscience, 2003. 177 p.
- Kendall M.M., Boone D.R. // The order Methanosarcinales. The Prokaryotes – a Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd ed. / Eds Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. New York: Springer, 2006. P. 244–256.
- Karakashev D., Batstone D.J., Angelidaki I. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 331–338.