

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИИ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Кафедра биотехнологии и микробиологии

**ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ СУММИРОВАННОЙ МИКРОБНОЙ
ДНК ИЗ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ОТХОДОВ**

Выпускная квалификационная работа
студента очной формы обучения
направления подготовки 19.03.01 Биотехнология
4 курса группы 07001419
Чупрынина Романа Николаевича

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор кафедры
биотехнологии и микробиологии
Батлуцкая И.В.

БЕЛГОРОД 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Процесс образования биогаза.....	5
1.2. Биогаз – альтернативный источник энергии.....	13
1.3. Биогаз в сельском хозяйстве	17
1.4. Технологии утилизации отходов сельскохозяйственных производств в различных странах мир.....	18
1.4.1. Технологии утилизации отходов сельскохозяйственных производств в Канаде.....	18
1.4.2. Технологии утилизации отходов сельскохозяйственных производств в Италии.....	21
1.4.3. Технологии утилизации отходов сельскохозяйственных производств в Украине.....	26
1.5. Развитие биогазового производства в России и Белгородской области.....	27
1.6. Развитие биогазового производства в мире.....	20
1.7. Методы получения ДНК микроорганизмов.....	31
1.8. Полимеразная цепная реакция в реальном времени	32
1.9. Cq – показания, снимаемые при ПЦР РВ.....	33
ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ	35
2.1. Выделение суммарной микробной ДНК из сельскохозяйственных отходов.....	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	39
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	44

ВВЕДЕНИЕ

При бактериологическом исследовании сельскохозяйственных отходов требуется решение задач, которые связаны с идентификацией микроорганизмов различных таксономических групп, в том числе патогенных и условно патогенных (Войнов 2009). Классические методы микробиологии, которые существуют в настоящее время, являются достаточно трудоемкими и длительными, при этом требуют использования большого количества питательных сред и вспомогательных операций (окраска по Граму, определение подвижности, проба на ферментативную активность и т.д.). Кроме того идентификация микроорганизмов до рода требует большого количества тест-систем для разных микроорганизмов, что не всегда является экономически выгодно (Великов 2013).

Актуальность исследования связана с изучением методов молекулярной биологии, которые позволяют проводить быструю идентификацию микроорганизмов отходов сельскохозяйственного производства.

Технологии молекулярного анализа имеют ряд преимуществ по отношению к традиционным микробиологическим методам. При проведении молекулярного анализа отсутствуют искажения, которые обусловлены недостаточной разрешающей способностью культурального анализа (Великов 2013).

Одним из наиболее перспективных методов количественного анализа микробиологических сообществ в настоящее время является полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР РВ). Этот метод является надежным инструментом для специфического количественного анализа нуклеиновых кислот (Рогатых и др 2011).

Достоверность молекулярно-биологических методов, которые применяют при анализе структуры микробиологических сообществ, зависит от качества препарата ДНК, которые получены в результате очистки. По причине неэффективного лизиса клеток, наличия в препарате ферментативных и других ингибиторов, сорбции ДНК на частичках грунта некоторые методы выделения ДНК могут вносить искажения в результат. Качество полученного препарата ДНК влияет на эффективность анализа, который основан на методах прямого определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) и клонирования, применяемых при изучении структуры сообществ (Грачев 2006).

Целью данного исследования является получение качественных препаратов суммарной микробной ДНК из отходов сельского хозяйства, которые используются на биогазовой станции «Лучки».

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Апробировать выбранную методику получения суммарной микробной ДНК из сельскохозяйственных отходов, которые используются на биогазовой станции «Лучки» в зимнее время года.
2. Определить процент содержания фирмикут в полученных образцах.
3. Разработать методические рекомендации для бакалавров и магистрантов кафедры биотехнологии и микробиологии по получению препаратов суммарной микробной ДНК их отходов сельского хозяйства.

Объектом исследования являлась масса сельскохозяйственных отходов отходов для получения биогаза, предметом исследования – выделяемая из нее суммарная микробная ДНК микроорганизмов.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Процесс образования биогаза

Биогаз является продуктом обмена веществ бактерий, который образуется в процессе разложения органического субстрата, состоит из метана (65%), углекислого газа (30%), сероводорода (1%) и незначительных примесей азота, кислорода, водорода и угарного газа (Столповская 2013). В основе получения биогаза лежит процесс метанового брожения, протекающий в анаэробных условиях (Вандышева 2014).

Процесс образования биогаза протекает в три последовательных стадии, в которых участвует огромное количество микроорганизмов.

В процессе первой стадии под действием экстрацеллюлярных ферментов происходит ферментативный гидролиз сложных органических соединений (белков, липидов, полисахаридов), в котором принимают участие бактерии родов *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyrivibro*.

Во второй стадии ферментации участвуют две группы микроорганизмов: ацетогенные и гомоацетатные, относящиеся к родам *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas* и *Desulfovibrio*. Ацетогенные H_2 -продуцирующие микроорганизмы участвуют в ферментации спиртов, моносахаридов и органических кислот, при этом образуются водород, углекислый газ, низшие жирные кислоты и некоторые другие низкомолекулярные соединения. Гомоацетатные микроорганизмы усваивают водород и углекислый газ, а также некоторые одноуглеродные соединения через стадию образования ацетил-КоА и превращения его в низкомолекулярные кислоты, в основном в ацетат.

На третьей стадии анаэробного разложения органических отходов происходит образование метана, который синтезируется через стадию восстановления углекислого газа молекулярным водородом, а также из

метильной группы ацетата. Некоторые метановые бактерии используют в качестве субстрата формиат, углекислый газ, ароматические соединения, метиламин, метанол (Баадер, Доне 2002).

Отходы продуктов жизнедеятельности сельскохозяйственных животных являются подходящей средой обитания микроорганизмов, в которой бактерии имеют возможность хорошо функционировать в многостадийном анаэробном процессе. Для этого им необходимо создать оптимальные условия их жизнедеятельности. Для метановых бактерий такими условиями является влажная среда, субстратах которой находится не менее 50% воды (Нетрусов и др. 2004).

Скорость процесса брожения находится в прямой зависимости с температурой: при повышении температуры увеличивается скорость разложения и количество газа на выходе, при этом количество метана в биогазе уменьшается. Это связано с тем, что при увеличении температуры растворенная в субстрате двуокись углерода интенсивнее переходит в газовую фазу (в биогаз), что приводит к снижению содержания метана. Количество газа, которое можно добыть, будет одинаковым при достаточном количестве времени брожения.

Существует три температурных режима, в которых происходит которые характерны для нормальной жизнедеятельности соответствующих штаммов микроорганизмов:

1. психрофильные штаммы микроорганизмов развиваются при температуре ниже 25°C.
2. мезофильные штаммы – при температуре 25-45°C;
3. термофильные штаммы – при температуре свыше 45°C.

Большинство биогазовых установок в настоящее время работают в мезофильном режиме. Та как происходит выделение большого количества тепла от генератора, то в установках наблюдается тенденция высоких температур ферментатора. Например, Германии большинство биогазовых установок работают при температурах от 38 до 42°C. Психрофильный режим

работы из-за длительного времени брожения и небольшого количества полученного газа в нашей местности является не столь важным по отношению к термофильному режиму, который в настоящее время приобретает все большее распространение (Нетрусов и др. 2009).

Бактерии подвержены изменениям в процессах жизнедеятельности из-за перепада температур. Данная зависимость четка видна термофильном режиме. В то время как в мезофильном режиме такие колебания не имеют практически никакого влияния на бактерии. Одноразовое размещение плохо уплотненного материала (с большим количеством кислорода) или большое количество очень холодного материала, а также остановка работы мешалки на несколько часов (в первую очередь в зимнее время), может вызвать изменение температуры на 1°C (Вандышева 2014).

Интересно, что в установках, работающих на возобновляемом сырье, наблюдаются более высокие температуры, по отношению к стационарным. При этом анаэробный процесс в отличие от компостирования не является экзотермическим.

Большое количество легко перерабатываемого субстрата, например, растительного, приводит к необратимым реакциям окисления с соответствующим выделением тепла. Например, в процессе брожения кукурузы температура увеличивается с 37 °C до 42 °C, что приводит к понижению потребления тепла установкой. Такой процесс должен наблюдаться для каждой установки отдельно и быть учтен спецификой установки. Установки, которые работают при высоких температурах должны быть оснащены специальными системами автоматизации и точного управления работой биогазовой установки. В настоящее время, когда речь идет о полной интеграции биогазовых установок в повседневной работе сельскохозяйственного предприятия, необходимо использовать мезофильный режим, который создает меньше сложностей. На сегодняшний день работа ферментатора осуществляется в более высоких температурных режимах, так как эксплуатация установки превратилась в отдельный вид деятельности и

требует соответствующего персонала. На протяжении длительного периода времени (1 месяц и более), бактерии привыкают к новому температурному режиму, и каждое предприятие может выбрать для себя оптимальный вариант (Панцхава 2014).

Процессы жизнедеятельности бактерий напрямую зависят от уровня рН. Если рН превышает оптимальный, то происходит замедление процессов жизнедеятельности бактерий, что приводит к уменьшению образования биогаза. Для процесса метанообразования уровень рН должен быть равен 7. Изменение уровня рН зависит от вида и количества добавляемого субстрата а Субстраты, которые подвержены быстрому процессу окисления, приводят к резкому уменьшению уровня рН; следовательно, их необходимо добавлять только в ограниченном количестве в течении всего процесса метанообразования. Разграничение субстратов зависит от их способности амортизировать уровень рН. Например, если концентрация H^+ возрастает, то субстраты принимают непосредственное участие в процессе ее выравнивания, но только в ограниченном количестве, и привязывают к себе свободные ионы, вследствие чего уровень рН в общем остается стабильным. Только когда связывающая и выравнивающая способность исчерпывается, уровень рН начинает расти. В любом случае такое медленно измеримое изменение содержания H^+ приводит к замедлению процессов жизнедеятельности бактерий и, следовательно, нарушению газообразования. Поддержание уровня рН является экономически выгодным способом контролирования процесса, но своевременное управление процессом исходя лишь из замеров уровня рН, является невозможным (Панцхава 2014).

Более эффективным в данном процессе является замер буферных свойств. Для эффективного протекания процесса необходимо наличие карбонатных и аммонийных буферов. Активизация карбонатного буфера происходит в кислой среде, в то время как аммонийного – в щелочной. Следует отметить, что в отходах сельского хозяйства буферные вещества представлены в большом количестве. Следовательно, наличие

сельскохозяйственных отходов, в частности навоза, может сглаживать большие колебания уровня рН и улавливать высокую кислотность. Такой буферный потенциал отсутствует у возобновляемого сырья, что приводит к увеличению уровня рН, и буфер аммония играет важную роль. В стабильных процессах брожения уровень рН регулируется самостоятельно.

Бактериям для процесса жизнедеятельности необходимы питательные вещества, витамины, растворимые соединения азота, минеральные вещества и микроэлементы. Все эти вещества содержатся в жидком и твердом навозе в необходимом количестве, а так же в сене, кукурузе (свежей или консервированной), остатках пищи, отходах кухни, внутренностях животных, барде и молочных продуктах. Для каждого вида субстрата или смеси субстратов можно произвести расчет соотношений веществ, при помощи которого можно своевременно определить возможную задержку процесса развития необходимых микроорганизмов из-за высокой концентрации азота. Для того чтобы жизнедеятельности микроорганизмов протекала в нормальных условиях, также необходимо присутствие в субстрате небольшом количестве тяжелых металлов и микроэлементов, но при этом в больших количествах тяжелые металлы могут оказывать сдерживающее или даже токсическое влияние. Никель, кобальт, молибден, вольфрам и железо являются особенно необходимыми бактериям для образования ферментов (Малофеев 1998).

Процесс образования биогаза может происходить с широким спектром питательных веществ, концентрация которых может быть как низкой так и высокой. (Панцхава 2014).

Процессы жизнедеятельности бактерий, которые влияют на выход биогаза, зависят непосредственно от качества самого субстрата. Так, например, при большей площади взаимодействия бактерий с более волокнистым субстратом, происходит быстрое разложение субстрата. Помимо этого, такой субстрат подвергается более простому процессу перемешивания, смешивания, а также подогревания без образования

плавающей корки или осадка. Качество измельченного сырья так же влияет на количество биогаза на выходе и влияет на длительность процесса брожения. Чем быстрее происходит процесс брожения, тем качественнее должен быть измельчен материал. В процессе длительного периода брожения происходит увеличение количества выработанного газа.

С целью избежания перекармливания бактерий, необходима равномерная подача субстрата в ферментатор через короткие интервалы времени, необходимо учитывать, что чем легче разлагается материал, тем чаще следует подавать субстрат. В результате чего удастся также избежать резкого снижения температуры. Наполнение ферментатора субстратом несколько раз в день на сегодняшний день практически невозможно, исключением являются субстраты с высоким содержанием буферным эффектом, к которым относят экскременты животных. Для больших установок субстрат необходимо подавать каждый час, для того чтобы достичь максимальной мощности.

Быстрое разложение метановыми бактериями субстрата возможно только при условии, что образовавшийся биогаз будет сразу же выводиться из субстрата, если же вывод газа из ферментатора не будет осуществляться, в нем будет образовываться высокое давление, которое нанесет ущерб биогазовой установки. В современном мире существует тенденция работы с субстратом, который содержит 18% сухого вещества, при этом происходит задержка выведения газа, что приводит к вздутию субстрата, которое может привести к поднятию крышки ферментатора. Следовательно, постоянное перемешивание необходимо не только для того, чтобы избежать корки и осадка, но и для выведения выработанного газа. Чем гуще субстрат, тем чаще надо его мешать.

В настоящее время существует множество субстанций, которые могут замедлить или же прекратить обмен веществ и рост микроорганизмов. Некоторые из них повреждают оболочку клеток или структуру бактерий., а другие разрушают ферменты. Следовательно, сдерживающим фактором

является не полное отсутствие определенного вещества, а его концентрация в соотношении с другими группами веществ, так например, при попадании кислорода с недостаточно обогащенным измельченным субстратом происходит нанесение вреда метановым бактериям. Антибиотики, химиотерапевтические и дезинфицирующие средства могут сдерживать процесс брожения или же привести к его полной остановке, если их концентрация в веществе будет достаточно высокой. Как правило такое происходит при проведении дезинфекции всего поголовья. В таком случае избежать проблемы поможет линия, ведущая из хлева прямо в емкость для хранения. Препараты, которые применяются к отдельным животным, как правило, не имеют негативных последствий. Влияние оказывает и накопление органических кислот, образование которых произошло при анаэробном разложении органических веществ. Информацию о состоянии процесса можно получить из информации о соотношении органических кислот. Так в процессе стабильного образования биогаза сумма органических кислот (их также называют эквивалентами уксусной кислоты) ниже 2000 мг/л. Если произошла быстрая подача свежих или очень легко разлагающихся субстратов, происходит быстрое окисление и накопление кислот до уровня 16000 мг/л, что приводит к целому ряду реакций, начиная с того, что большие концентрации кислот сдерживают сами бактерии таким образом, что понижается уровень рН, что и вызывает задержку развития метановых бактерий до полной остановки процесса разложения. Противодействовать этому можно лишь полным сокращением подачи субстрата.

В современном мире существует множество установок, которые стабильно работают с большой концентрацией кислот и имеют большую производительность газа. В таких случаях важной являлась медленное и постепенное приспособление к новой среде.

При разложении субстратов, которые содержат серу, (преимущественно белки), происходит образование высокотоксичного

практически для всех живых существ сероводорода (H_2S). Чем ниже уровень pH, тем выше процент H_2S в субстрате и биогазе, и тем выше потенциал токсичности. Если содержание H_2S в растворе 50 мг, то происходит задержка развития бактерий. Для уменьшения процента риска необходимо увеличение содержания расщепляемых углеродных соединений в субстрате (эффект разбавления). В субстратах, содержащих серу, могут появляться штаммы бактерий, использующие водород для образования сероводорода. Данные группы бактерий могут вступать в конкурентные отношения с метановыми бактериями за водород. Что приводит к уменьшению метанообразования, при этом образовавшийся сероводород сам сдерживает развитие метановых бактерий. Несмотря на это сера является важным питательным элементом субстрата, так как она является необходимым компонентом образования биомассы бактерий.

Концентрация сероводорода в газообразном либо жидком виде в зависимости от уровня pH. Несмотря на это сера является важным питательным элементом субстрата, поскольку она необходима для образования биомассы бактерий.

В результате процесса анаэробного разложения азотосодержащих субстратов происходит образование аммония (NH_4). Исходя из того, что около 50-60% от общего содержания азота сохраняется в переброженном субстрате в виде аммония-азота, который в свою очередь в состоянии раствора с аммиаком, являющимся сильным ядом для нервов и клеток. В данном случае увеличение концентрации аммония зависит от уровня pH и температуры субстрата. Если уровень pH высокий и температура высокая, то баланс изменяется в сторону аммиака. Если $pH = 7$, то соотношение аммония- аммиак 99:1. При повышении уровня $pH = 9$, соотношение также меняется 70:30.

В большинстве случаев аммоний в соединениях находится в виде растворенного вещества, что позволяет использовать материал повторно

после прохождения через фильтр. Все вышеизложенные факты стоит учитывать при планировании и закладывании размеров ферментатора.

Бактерии, которые участвуют в процессе образования биогаза, постоянно нуждаются в достаточном количестве питательных веществ, хорошего качества, для того чтобы не происходило прекращение процесса их жизнедеятельности

Токсичность тяжелых металлов находится в прямой зависимости от их растворимости в воде. Тяжелые металлы воздействуют на ферменты клеточного обмена веществ и в больших концентрациях негативно влияют на жизнедеятельность бактерий. При этом четкой границы между сдерживающим и токсическим воздействием пока не найдено, так как у бактерий существует высокая приспособленность к выживанию в различных условиях. При образовании тяжело растворимых сульфидов металлов с H_2S и выпадении в осадок в виде твердого вещества ионы тяжелых металлов становятся недееспособными. Субстраты, в которых находится большая концентрация тяжелых металлов, должны быть подвержены постоянному анализу.

В современном мире для производства биогаза чаще всего используют отходы животноводства, что обеспечивает охрану окружающей среды

Процесс метанового брожения занимает особое место при утилизации отходов, так как позволяет получать биогаз из местного сырья, использовать который можно как локальный источник энергии, а также для защиты окружающей среды от загрязнений и улучшения качества органического удобрения (Панцхава 2014).

1.2. Биогаз – альтернативный источник энергии

Биогаз возникает в следствии разложения органической субстанции, которая состоит преимущественно из воды, белков, жиров, углеводов и минеральных, веществ на их первичные составляющие – углекислый газ, минералы и воду. Продуктом обмена веществ в данном случае является смесь газов.

Метан (CH_4) составляет от 5 до 85%, являясь основным компонентом энергосодержащим компонентом. Данный процесс разложения отходов возможен при протекании в анаэробных условиях, то есть только при отсутствии проникновения кислорода. Этот процесс разложения называют также гниением - его можно наблюдать в болтах, озерах, трясинах и т.д. Если же в среде присутствует кислород, то разложение органических соединений происходит в присутствии аэробных микроорганизмов, процесс называется компостированием. К естественным процессам разложения также относят горение, переваривание и брожение. Энергия, которая освобождается в процессе анаэробного процесса, не расходуется в виде тепла при компостировании, а превращается в молекулы метана в процессе жизнедеятельности метановых бактерий. Метановые бактерии относятся к древней группе и наиболее приспособленных живым существ на планете Земля. Процессы гниения имеют широкое распространение: в лесах, морях, реках и озерах, болотах, шарах грунта, куда не проникает кислород, на свалках мусора, в навалах навоза, лагунах, отстойниках навоза, на участках выращивания риса и в продуктах жизнедеятельности жвачных парнокопытных животных. В большинстве случаев из любых органических соединений при условии отсутствия кислорода можно получить биогаз((Зебзеев 2017). При этом бактериям необходимо определенное количество времени, для того чтобы справиться со сложноразлагаемым материалом. Такой процесс целенаправленно используют при очистке сточных вод, для того чтобы провести разложение органических соединений вредных веществ.

Метан, который содержится в биогазовой смеси, имеет энергетическую ценность от 10 кВт/м³ (применительно к чистому метану), являясь таким же газом, как и природный газ. Если смесь газов переводить в электрический ток с помощью генератора, то при его эффективности напр. 35% с 10 кВт брутто образуется 3,5 кВт электрического тока, который можно непосредственно подавать в сеть электрического питания. Энергия, получаемая при образовании биогаза, является возобновляемой, так как происходит из органического возобновляемого субстрата.

В современном происходит исчерпание ископаемых энергоносителей, при этом образуется потребность в альтернативных источниках, что придает производству биогазу на биогазовых установках еще большее значение. Кроме того, энергетическое использование биогаза по сравнению со сжиганием природного газа, сжиженного газа, нефти и угля является нейтральным по отношению к содержанию CO₂, так как выделяемый CO₂ находится в пределах нормы в естественном круговороте углерода и потребляется растениями на протяжении вегетационного периода. Таким образом, концентрация CO₂ в атмосфере по сравнению с использованием твердого топлива не увеличивается. Метан также имеет недостатки, так при попадании в воздух происходит окисление метана на двуокись углерода и воду под воздействием солнечных лучей, после чего становится наиболее распространенным загрязнителем воздуха и на 20% вызывает явление парникового эффекта. Кроме того, при окислении метана происходит потребление озона, что приводит к увеличению озоновой дыры в стратосфере. Газовый факел, при помощи которого в аварийных случаях сжигают газ до неопасной двуокиси углерода, имеет большое значение также по этой причине. До периода индустриализации производство метана и его расщепление пребывали в равновесии. Сегодня этот баланс в значительной мере нарушен: при добыче угля, нефти и природного газа выделяется огромное количество метана в атмосфере. Происходит увеличение количества газа, которое возникает во всем мире от выращивания риса и

животноводства. За последние десятилетия данный круговорот углекислого газа и органических веществ привел к постоянному возрастанию метана в атмосфере Земли. По этой же причине также потребление биогаза в технических целях имеет особое значение, поскольку, таким образом, уменьшается эмиссия метана (Благутина 2007).

Превращение отходов в удобрения микробиологическим методом является самым простым и распространенным методом утилизации навоза и птичьего помета (Кузнецов 2007). В сельском хозяйстве Российской Федерации сложилась парадоксальная ситуация: отходы животноводства являются основными загрязнителями природной среды, почвы теряют гумус, что приводит к уменьшению их плодородия (Касьянов и др. 2008).

Технологический процесс в зависимости от производственных мощностей конструкции биоферментеров в разных климатических условиях при участии микроорганизмов позволяет перерабатывать отходы сельского хозяйства в любом количестве.

Прямая утилизация отходов для использования в дальнейшем в качестве подкормки для сельскохозяйственных животных требует составления определенных природных субстратов. Многие отходы нельзя использовать в качестве компонентов питания, несмотря на их значительную питательную ценность и энергоемкость. Питательную ценность отходов можно повысить путем предварительной их обработки и регулирования процесса биоферментации при помощи изменения диапазона температур. Так как в современном мире требования к охране окружающей среды являются достаточно строгими, то использование животноводческих отходов является экономически выгодным ресурсом. В скором будущем появится возможность создания безотходного предприятия в целом — идеального современного способа переработки сельскохозяйственной продукции (Касьянов и др. 2008).

Переработка отходов при участии микробных сообществ создает все условия для качественной и количественной утилизации отходов, а также обеспечивает более тонкий контроль за санитарным состоянием целевого

продукта и за протеканием технологического процесса. Данные методы предполагают организацию экологически чистого и энергосберегающего производства. Вся продукция переработанных отходов (в том числе и побочная) имеет практическое применение в земледелии, животноводстве, микробиологической и пищевой промышленности и т. д.

Переработка отходов при участии микробных сообществ создает все условия для качественной и количественной утилизации отходов, а также обеспечивает более тонкий контроль за санитарным состоянием целевого продукта и за протеканием технологического процесса. Данные методы предполагают организацию экологически чистого и энергосберегающего производства. Вся продукция переработанных отходов (в том числе и побочная) имеет практическое применение в земледелии, животноводстве, микробиологической и пищевой промышленности и т. д. (Касьянов и др. 2008).

1.3. Биогаз в сельском хозяйстве

Сельскохозяйственная промышленность является значимой статьей бюджета Российской Федерации. Объем сельскохозяйственной продукции в России в 2017 году составил 5,7 трлн рублей (около \$100 млрд). Животноводческая промышленность составляет 46% от общего объема сельскохозяйственного производства (Чумаков 2010).

Актуальной проблемой сельскохозяйственной промышленности является проблема переработки отходов, так как их количество на сегодняшний день достигает 600 млн. тонн в год, причём большая часть этих не подвергается утилизации, что приводит к отчуждению сельскохозяйственных земель, загрязнению грунтовых вод, окислению почв,

и выбросу в атмосферу метана (Эффективные технологии утилизации органических отходов 2015).

Производство биогаза в сельском хозяйстве является решением нескольких проблем одновременно:

1. уменьшением энергетической зависимости,
2. уменьшением выбросов парниковых газов,
3. уменьшением загрязнения окружающей среды отходами сельскохозяйственного производства,
4. отсутствием на предприятии неприятного запаха.

Затраты на строительство биореакторов в значительной мере выгоднее, чем строительство отстойников для хранения продуктов жизнедеятельности животных (Кирюшатов 1991).

Так, например, использование органических удобрений, которые были получены на биогазовых установках, повышает урожайность сельскохозяйственных культур от 30 до 50% (Панцхава и др. 2001). При этом переброшенная масса является экологически чистым жидким или твердым сбалансированным биоудобрением, которое лишено нитритов, патогенных микроорганизмов, специфических запахов (Эффективные технологии утилизации органических отходов 2015).

Установив биогазовую установку, предприятие имеет свою, по сути, бесплатную электроэнергию, что способствует существенному снижению стоимости продукции, которое приводит к получению дополнительных конкурентных преимуществ (Стребков, Ковалев 2006).

1.4. . Технологии утилизации отходов сельскохозяйственных производств в различных странах мир

1.4.1. Технологии утилизации отходов сельскохозяйственных производств в Канаде

Группа Канадских компаний обладает технологией и выпускает оборудование, которое направлено на переработку куриного помёта в сухое топливо, а также получение тепловой и электроэнергии. Сухой куриный является так же топливом как и дерево, так как их калорийности практически одинаковы, но для того, чтобы использовать его в качестве топлива необходимо знать технологию его сушки и сжигания.

Сушка куриного помёта происходит в процессе его измельчения под физическим воздействием:

1. Влажный материал загружается в роторную камеру, где подвергается воздействию кинетической энергии ротора, который вращается с угловой скоростью до 640 километров в час. Огромные центробежные силы отслаивают воду от внешней поверхности кусков материала. В процессе измельчения появляются новые поверхности материала, новые открывшиеся слои воды отслаиваются от материала и удаляются. Этот механизм сушки основан на механических силах удаления воды из материала.

2. Кинетическая энергия от многочисленных ударов нагревает частицы на короткий промежуток времени выше 100 °С, поэтому вода в частицах превращается в пар. Пар выделяется из частиц и мгновенно превращается в очень мелкие капельки воды, поскольку температура внутри камеры никогда не бывает выше 90 °С. Вода также выделяется из материала, поскольку сила удара выжимает воду из частиц материала. Поэтому частицы материала теряют содержащуюся в них воду без применения какого либо наружного нагрева, а за счёт воздействия механических сил.

3. Температура воздуха внутри камеры 70 - 90°С, поскольку ротор нагревается от трения в течении процесса измельчения, а также из за процесса аэродинамического нагрева воздуха. Очень высокий коэффициент передачи тепла и массы из-за крайне высоких ускорений частиц обеспечивает практически мгновенную передачу влаги от частиц в окружающий воздух. Большая суммарная поверхностная площадь частиц

также способствует высокой скорости передачи массы влаги. Этот процесс чисто термический.

4. Уничтожение бактерий происходит в основном за счёт воздействия кинетической энергии и кинетического нагрева частиц во время их удара об отражательные пластины, ротор и стенки камеры. Эти многочисленные удары поднимают температуру частиц до уровня выше необходимой для пастеризации бактерий. Кроме того, огромные ускорения, которым подвергаются частицы, ломают стенки клеток бактерий, убивая их. Уровень запаха высушенного куриного помёта после BPS, во много раз ниже, чем до обработки, что свидетельствует о том, что большинство бактерий убито.

Система BPS применяется во многих странах мира для сушки и измельчения биомассы: США, Канада, Япония, Корея, Бразилия, Малайзия и т.д.

Во время переработки куриного (бройлерного) помёта, сырой куриный помёт с влажностью ~ 30% подаётся по транспортёру в систему BPS. После системы BPS получают сухой порошкообразный материал с минимальным запахом, который можно использовать для получения энергии, а также для производства удобрений.

Пылевые топки высокой интенсивности были разработаны специально для эффективного и полного сжигания трудносжигаемых видов топлива в соответствии с самыми жёсткими требованиями нефтехимической индустрии. Эти системы показали себя надёжными и высокоэффективными в промышленном применении (Кузнецов 2011).

Пылевые топки используются как источник тепла в различных промышленных нагревателях и энергосистемах.

Экстремально короткое и чётко очерченное пламя позволяет использовать небольшие по размерам камеры сгорания. Порошкообразное топливо подаётся в топку через установленный в центральной части топки инжектор. Вихревое вращение воздуха, подаваемого в топку, создаётся за счёт специальных лопастей, установленных в основании топки. Крутящийся

воздух создаёт циркулирующий вихрь внутри топки, что ведёт к интенсивному перемешиванию пылевидного топлива и воздуха.

Такое интенсивное смешивание обеспечивает эффективное и полное сжигание топлива и очень ровное распределение температуры внутри топки.

Улучшенное распределение тепла уменьшает потери тепла и увеличивает эффективность сжигания. Способность работать с минимальным объёмом избытка воздуха (2%) и обеспечивать полное сгорание уменьшает падение тепла при избытке воздуха (Кузнецов 2011).

1.4.2. Технологии утилизации отходов сельскохозяйственных производств в Италии

Технология промышленного производства искусственного гумуса из органических отходов птицеводства (куриного помета) основывается на современных теоретических представлениях о структуре и динамике природного носителя почвенного плодородия - гумусе. Согласно данным представлениям действующим началом гумуса, который определяет его высокую биологическую активность и способность к производству, являются макроциклические комплексы органических природных веществ, главным образом гуминовых кислот, с ионами переходных металлов (Fe, Cu, Mn) и щелочноземельных элементов (Ca, Mg). Данные фрагменты, связываются своими активными группами (-OH, -COOH, -NH₂) с комплексообразующими ионами и образуют сплошную лигандную оболочку, которая способна в строго определенных условиях сбалансированного протонно-апротонного катализа наращиваться, при этом происходит внедрение в данный процесс новых атомов металлов, образующих кластерную цепочку внутри прочной гидрофобной лигандной оболочки. Таким образом формируются достаточно прочные трубчатые макромолекулы. Такие комплексы, которые включают в

себя полный набор питательных веществ и конституционную воду, обеспечивают растения всеми необходимыми веществами для интенсивного роста и развития.

Существенным отличием предлагаемого способа получения гумусоподобного удобрения от известных аналогов является:

1. многократное ускорение образования макрокомплексов в условиях действия на субстрат электрических полей специальной формы при его интенсивном диспергировании и гомогенизации;

2. многократное снижение удельных энергозатрат на получение каждой тонны гранулированного органического удобрения.

При получении искусственного гумуса происходит заполнение бункера-питателя предварительно подготовленным куриным пометом, отчищенным от инородных объектов. Технологический процесс получения искусственного гумуса начинается с заполнения бункера-питателя (дозатора) предварительно подготовленным (очищенным от инородных включений - щебня, металлических предметов) куриным пометом, затем происходит заполнение второго бункера - питателя компонентами-носителями ионов, если это необходимо. Далее идет частичное измельчение и перемешивание в дезинтеграторе - смесителе до получения пластичной однородной массы, для того чтобы подать ее в реактор, где будет происходить процесс образования искусственного гумуса.

Существует несколько вариантов состава исходного сырья.

Вариант 1: Сырьем является птичий помет, взятый из накопителя-отстойника с исходной влажностью - 45-85% (в случае уборки птичников гидросмывом), который добывается фекальным насосом.

На входе в сетках заборников происходит очистка сырья от грубых посторонних включений и металла.

Вариант 2: Сырье является птичий помет из птичников (в случае уборки птичников с использованием скребковых транспортеров), влажность которого 75%, после чего направляется в бункер-накопитель комплекса.

В процессе перемещения сырья в реакторе происходит его измельчение, смешивание, предварительная сушка и гумизация, ускорение которой увеличивается до 10 раз по сравнению с обычным электролизом. Далее происходит обеззараживание органических масс, структурирование воды, превращение части вредных веществ и газов (меркаптанов, аммиака, сероводорода и др.) в полезные вещества за счет воздействия электромагнитного катализатора на каждую молекулу по всему объему вещества, температуры и водорода.

На выходе из реактора происходит связывание хлора и фтора в экологически безопасные вещества и полезные вещества такие как CaF. Образовавшиеся при данном процессе газы подаются в блок электроочистки, где происходит окончательное разложение соединений серы элементарные вещества, при этом сера осаждается на холодных стенках поддона Нетрусов и др. 2004).

Реактор выдерживает давление внутри корпуса не менее 5 атмосфер.

Реактор обеспечивает:

1. измельчение сырья и реагентов до размера частиц не более 20 мкм;
2. получение гомогенной смеси;
3. получение биологически активных металлоорганических соединений переходных металлов (Fe, Cu, Mn....) и щелочно-земельных элементов (Ca, Mg) с фрагментами натуральных органических соединений.
4. дегидратацию удобрения до влажности не более 30%;
5. возможность замены электродной системы по мере ее износа за время не более 10 минут.

Чистый гумус из зоны комплексования реактора поступает в зону сушки реактора (дегидратации). В выпускаемых промышленностью дегидраторами удаление воды происходит за счет ее испарения. Это энергоемкий процесс - на испарение 1 тонны воды затрачивается до 1000 кВт час электроэнергии.

В дигидраторе, который установлен на комплексе, удаление 40% структурированной воды производится в виде тумана, если температура находится в пределах при 50 - 80 °С – без испарения, данный процесс происходит в результате действия электрического катализатора. При этом расход энергии уменьшается до 10 раз меньше, то есть расходуется 100 кВт/ч электроэнергии.

Дальнейшая сушка продукта осуществляется в результате использования водорода, вредных газов и веществ, которые образовались в реакторе в качестве сушильного агента. При этом вредные вещества превращаются в экологически безопасные (Германович и др. 2014).

Система газоотведения

Функциональное назначение: отсос паров воды и газов и их очистку (утилизацию) перед выбросом в атмосферу;

Система газоотведения комплекса обеспечивает:

1. предварительную очистку и дезактивацию газов, выделение которых происходит в процессе работы реактора (аммиака, водорода, кислорода, меркаптанов, азота и др.) и доведение выбросов до требований ПДК с проверкой эффективности очистки;
2. конденсацию очищенных паров воды с получением дистиллята;
3. сигнализацию утечки метана и водорода из системы;

Система водоотведения обеспечивает:

1. удаление избыточной воды в процессе дегидратации продукта;
2. отвод воды в стандартные отстойники;
3. возможность использования получаемой жидкой фракции на основе активированной воды в сельском хозяйстве.

Линия грануляции выходного продукта обеспечивает гранулирование модифицированного куриного помета с размерами гранул не более 2-2,5 мм;

Сырье (в большинстве случаев куриный помет) предварительно проходит очистку от инородных включений и затем доставляется в бункер – питатель, в который добавляются различные компоненты. После чего сырье

и компоненты (при необходимости) при помощи шнековых транспортеров подаются в блок предварительной подготовки субстрата - дезинтегратор - смеситель. В данном блоке происходит измельчение материалов, гомогенизация и получение пластифицированной биомассы, которая далее перемещается при помощи шнекового транспортера в реактор.

В реакторе, который разделен на функциональные зоны, происходит осуществление технологических операций над материалом - куриным пометом, которые в последствие приводят к модификации его параметров.

В первой зоне происходит интенсивное измельчение материалов до микрочастиц, а также тщательное смешение до получения гомогенной массы. В этой же зоне осуществляются процессы комплексования фрагментов органических веществ с переходными и щелочноземельными металлами под действием приложенного к системе электродов, размещенных в этой зоне реактора, электрического напряжения с заданными параметрами. (Мариненко 2013). Протекание физико-химических процессов в данной зоне реактора сопровождается выделением газообразной фазы, содержащей пары активированной влаги, водорода, меркаптанов, аммиака, сероводорода и др., которые здесь же за счет воздействия на каждую молекулу по всему объему вещества электромагнитного катализатора, температуры и водорода превращаются большей частью в полезные вещества. Образовавшиеся газы подаются в блок газоотведения и электроочистки, где они разлагаются на элементарные вещества, а сера осаждается на холодных стенках поддона .

Из первой зоны реактора обработанная биомасса перемещается в зону дегидратации (обезвоживания до определенных параметров) и далее подается принудительно на устройство гранулирования, в котором оно окончательно и досушивается до требуемой влажности.

Далее уже обеззараженные (полностью подавляется патогенная микро- и макрофлора, семена сорняков теряют всхожесть, устраняется запах) гранулированные удобрения подаются либо в линию расфасовки в мешкообразную тару для последующего складирования и реализации.

Жидкая фракция, образование которой происходит в процессе производства гранулированных удобрений, при помощи системы водоотведения направляется в емкости - отстойники. Жидкая фракция должна пройти химический анализ на предмет ее дальнейшего использования. Осажденная из газообразной фазы структурированная вода может найти достойное применение как в сельскохозяйственной практике, так и в других сферах (Свергузова 1999).

1.4.3. Технологии утилизации отходов сельскохозяйственных производств в Украине

Крупные животноводческие комплексы являются экономически выгодными, так низкую себестоимость и высокую рентабельность, но при этом они являются мощными источниками загрязнений, которые поступают в окружающую среду.

Кафедрой биотехнологии ГВУЗ УГХТУ разработана технология биопереработки свиного навоза методом вермикюльтивирования с использованием гибрида красного калифорнийского червя *Eiseniafoetida* с целью утилизации этих крупнотоннажных отходов и использование полученных продуктов в качестве экологически безопасного удобрения (биогумуса) (Малофеев 1998).

Микробиологическая подготовка субстратов на основе навоза для использования вермикюльтуры заключается в стабилизации подверженных гниению органических веществ, сохранении большого количества питательных и органических веществ и получении однородного, подходящего для культивирования этих червей субстрата (Малофеев 1998).

Образование вермикомпоста из свиного навоза состоит из двух стадий (ресинтеза и синтеза). На первой стадии под действием ферментов

микроорганизмов нарушается анатомическое строение навоза, а сложные органические соединения (белки, жиры, углеводы и др.) распадаются на простые или промежуточные продукты превращения (Малофеев 1998).

В результате проведенных исследований было установлены оптимальные условия вермикультивирования на субстратах на основе свиного навоза:

1. продолжительность ферментации – 1 месяц;
2. влажность – 70-80%;
3. температура субстрата –20-25°C;
4. содержание общего азота – 1,8-2,3%;
5. содержание калия – 1,8-3,2%;
6. содержание фосфора – 1,0-1,5%;
7. содержание гумуса – до 13%;
8. содержание органических веществ – до 54%.

Вермикомпост также содержит микроэлементы (Mg, Cu, Zn, Mn, S), что дает возможность сделать вывод относительно использования этого биопродукта как органического удобрения (Малофеев 1998).

1.5. Развитие биогазового производства в России и Белгородской области

В СССР проводились исследования биогаза, начиная с 1940 г. В 1948-1954 гг. была разработана и построена первая лабораторная установка по утилизации навоза от десяти коров, обеспечивавшая выход 1 м³ газа с 1 м³ реактора, данная технология не получила широкого распространения. В связи тем, что в середине 1970-х гг. произошел энергетический кризис, возрос интерес к технологиям энергосбережения. В 1981 году была создана специализированная секция по программе развития биогазовой отрасли,

которую курировал Госкомитет по науке и технике, но так как отсутствовало материальное обеспечение, многие мероприятия, которые были направлены на освоение технологии анаэробной переработки биомассы, были не реализованы. При этом было создано несколько установок, которые носили опытный характер. Запорожский конструкторско-технологический институт сельскохозяйственного машиностроения являлся крупнейшим центром по разработке установок. Завод построил 10 комплектов оборудования, но, после распада СССР из десяти установок две остались в Украине, одна — в Белоруссии, пять — в Средней Азии, две — в России. Единственная установка, эксплуатация которой осуществлялась в Белоруссии, вырабатывала 400-500 м³ газа в сутки из 50 м³ навоза (Панцхава 2014).

В настоящее время растет интерес к биогазовым установкам, это обусловлено высокой стоимостью энергоресурсов и удобрений. Российский рынок биогаза находится на ранней стадии развития и обладает огромным потенциалом для использования возобновляемых, нетрадиционных, альтернативных источников энергии на основе переработки биологических отходов (Зебзеев 2017).

При интенсивном подъеме сельскохозяйственного производства России через несколько лет общий объем производимых органических отходов может составить 675 млн. т (по сухому веществу), а потенциальное производство биогаза – 225 млрд. м³/год (Шигапов 2014).

В РФ главным преимуществом производства биогаза по отношению к другим альтернативным источникам энергии является доступность сырья, а также отсутствие затрат на топливо (Амерханов 2000).

В настоящее время, несмотря на то, что в России существуют все условия для развития биогазовой отрасли, биогазовых установок считанные единицы (Зебзеев 2017).

В 2009 году была запущена первая биогазовая установка, которая располагается в деревне Дошино Калужской области. В Белгородской области запустили биогазовые станции «Байнцуры» на базе свиноводческого

комплекса, а затем «Лучки». Так же созданы Агрохолдинг «Мосмедынь агропром» в Калужской и Агрокомплекс «Мансурово» в Курской областях.

В настоящее время Белгородская область является лидером по производству биогаза в Российской Федерации. На сегодняшний день в области планируется строительство трех новых биогазовых станций. По прогнозам специалистов 10 % всей российской электроэнергии будет производиться биореакторами Белгородской области (Опыт Белгородской области: биогаз и биоудобрения 2015).

Строительство биогазовой станции «Байцуры», построенной ГК «Агро-Белогорье», было закончено в ноябре 2011 года, открытие состоялось в апреле 2012 года. Данная станция являлась пилотным проектом, осуществление которого велось в рамках программы строительства сети биогазовых станций в Белгородской области суммарной мощностью 10 МВт. Целью данного проекта было создание бизнес-модели, которая удовлетворяла бы требования кредиторов для последующего тиражирования полученного опыта. Вся энергия, получаемая биогазовой станцией «Байцуры», продается в сеть с надбавкой около 5%.

На данный момент мощность биогазовой станции около 500 кВт, увеличение которой планируется до 1000 кВт. Сырьем для выработки энергии служат свиной навоз и кукурузный силос. Выход биогаза составляет 890 м³/день от навоза (СН₄ – 60%), от силоса – 3242 м³/день (СН₄ – 52%). В результате работы станции в день производится 4133 м³ биогаза (Опыт Белгородской области: биогаз и биоудобрения 2015).

Крупнейшей биогазовой станцией в России на сегодняшний день является биогазовая станция «Лучки», которая расположена в Прохоровском районе Белгородской области. Данная станция является совместным проектом, реализованным компанией «Альт-Энерго» и ГК «Агро-Белогорье». Годовой объем выработки электроэнергии составляет 19,6 млн кВт/ч, тепловой энергии – 18,2 тыс. Гкал тепловой энергии, а также 67 тыс. тонн органических удобрений.

В год данная установка перерабатывает около 14 600 тонн отходов мясоперерабатывающего завода («МПЗ Агро-Белогорье»), 26 000 тонн свиноводческих стоков, 1800 тонн канализационных отходов в виде шлама, 26 000 тонн силоса. Так же продуктом ферментации является биологическое удобрение, которое собирается в специализированных хранилищах, после чего эта биомасса, богатая азотом и фосфором, выкачивается в цистерны и вносится на поля агрохолдинга (Белгородский институт альтернативной энергетики).

1.6. Развитие биогазового производства в мире

В настоящее время биогазовые технологии являются основными технологиями, применяемыми во многих странах мира для очистки сточных вод и переработки отходов.

Рынок биогаза во всем мире развивается стремительными темпами. Лидерами по производству биогаза являются США, Китай, Индия, Бразилия, Европейский союз (Владимирова 2013).

В Швеции, Австрии, Финляндии на долю производства энергии из биогаза приходится около 15-20% (Панцхава 2014).

В настоящее время 5% транспорта Швеции переведено на биогаз. В стране предусмотрены льготы при использовании экологически чистых транспортных средств, в том числе работающих на биогазе.

Лидером по производству биогаза в настоящее время является Германия, в стране функционирует более 400 биогазовых установок. По прогнозам производство энергии из биогаза в Германии к 2020 будет составлять около 112 млн. тонн биомассы, это позволит вырабатывать 39,8 кВт·ч/год энергии.

Перспективы развития биогазового производства есть у Испании, Италии, Дании, Бельгии, Нидерландов.

В США развитие биогазового производства законодательно поддерживается на федеральном уровне. В стране существуют и развиваются программы в данном направлении, происходит развитие бизнеса. На данный момент биогазовое производство дает 8% электрической энергии. Большое количество биогазовых фермерских установок находится в Калифорнии, Пенсильвании, Висконсине и Нью-Йорке.

Китай на данный момент является лидером по внедрению технологий биогазового производства в сельских районах страны. Типичная китайская установка имеет объем около 6-8 м³, производит 300 м³ газа в год и стоит примерно \$200-250. С 2002 года правительство инвестирует в развитие биогазовых установок ежегодно около 200 млн. долларов. Примерно 50% стоимости установки компенсируется государством. В настоящее время ставится задача достичь к 2020 году уровня 25 млрд. м³ биогаза в год, что даст возможность обеспечить им 300 млн. человек. Кстати, к этому же времени в Китае планируется потреблять ежегодно 10 млн. т биоэтанола и 2 млн. т биодизеля (Зебзеев 2017).

1.7. Методы получения ДНК микроорганизмов

Процесс выделения ДНК из клеток и тканей является основным этапом для проведения исследований живого организма на молекулярном уровне (Жиленкова и др. 2014). При наличии выделенной ДНК, далее становятся возможными ее амплификация (с помощью полимеразной цепной реакции – ПЦР), определение последовательности (секвенирование), рестрикционный анализ, клонирование, гибридизация (Запороженко и др 2006), (Klintschar 2000), (Roesch и др.2007).

Для того, чтобы провести процесс выделения ДНК в общем случае необходимо провести разрушение клетки различными способами, после чего отчистить от других клеточных компонентов (Грачев 2006).

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

- 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом);
- 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;
- 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл (Torsvik и др.1990), (Torsvik и др. 1998).

Затем ДНК осаждают раствором этанола, центрифугируют и растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы. Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия или хаотропный агент гуанидинизотиоцианат. Если нет необходимости в длинных целых фрагментах ДНК, клетки можно разрушить механическим способом путем перетирания со стеклом или речным песком в жидком азоте. Ряд современных методов предусматривает сорбцию ДНК на гранулах силикагеля в присутствии хаотропных веществ, центрифугирование и последующую элюцию ДНК с гранул в раствор. Некоторые фирмы продают наборы реактивов для выделения ДНК с использованием магнитных частиц, покрытых силикой SiO₂. Некоторые коммерческие наборы предусматривают сорбцию ДНК на мембранах или ионообменных сорбентах. Фенол-хлороформный метод экстракции ДНК считается стандартным (Запороженко и др. 2006), (Piterina и др. 2010).

1.8. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

В современном мире широкое распространение получают различные модификации метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Ребриков 2009). Происходит активное внедрение высокочувствительного и высокоспецифичного метода ПЦР «в реальном времени» (ПЦР РВ). Данный метод основан на регистрации результатов в процессе протекания реакции. Метод ПЦР РВ включает в себя одновременную детекцию и количественное определение специфической последовательности ДНК в образце (De Gregoris и др. 2011).

ПЦР РВ отличается от ПЦР наличием мониторинга и количественного анализа накопления продуктов ПЦР, автоматической регистрации и интерпретации полученных результатов (Бикбулатова и др.2012).

Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для детекции ДНК в процессе ее амплификации использует флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды. Данный метод позволяет проводить полный анализ проб в течение 20-60 минут (Guo и др 2008), .

В процессе количественного анализа используются два метода — флюоресцентные красители, которые подвергаются интеркаляции в двуцепочечные молекулы ДНК, и модифицированные дезоксинуклеотиды, флюоресцирующие после процесса гибридизации с комплементарными участками ДНК.

Для проведения ПЦР РВ используют детектирующие ПЦР–амплификаторы, которые способны регистрировать уровень флуоресценции внутри реакционной пробирки через прозрачную крышку или дно пробирки (Бикбулатова и др.2012).

1.9. C_q – показания, снимаемые при ПЦР РВ

Прибор для ПЦР РВ в отличие от прибора для ПЦР способен осуществлять регистрацию флуоресценции в реакционной смеси, в которую добавляется краситель, флуоресцирующий в присутствии двухцепочечной ДНК. Количество ДНК-матрицы в смеси находится в ничтожно малых количествах в сравнении с количеством накапливающегося ПЦР-продукта, поэтому флуоресценция является показателем скорости прохождения реакции. Прибор строит графики флуоресценции в каждой пробирке с реакционной смесью от времени, точнее, от номера температурного цикла. Прибором автоматически выставляется условное пороговое значение флуоресценции, которое является единым для всех проб, отражающее порог надёжной, количественно достоверной регистрации сигнала. Временная точка пересечения растущим графиком флуоресценции этого порога обозначается как C_q («cycle quantity», «количество циклов»). Это и есть количество температурных циклов амплификатора, потребовавшееся для достижения пороговой интенсивности флуоресценции в данной пробирке. Сама по себе эта величина научного содержания не несёт, содержание она получает при сопоставлении её значений для различных проб с применением специально разработанных методов проведения и обчёта экспериментов.

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. Выделение суммарной микробной ДНК из сельскохозяйственных отходов

Выделение суммарной микробной ДНК из сельскохозяйственных отходов проводили следующим образом :

Пробу, взятую из Ферментатора №1, объемом 500 мкл помещали в 2 микропробирки с лизирующим раствором, затем добавляли Sodium Phosphate в объеме 978 мкл, после чего добавляли 122 мкл MT Duffer и взбивали в течение 4-5 минут, для того чтобы разрушить поверхность клетки. Микропробирки со смесью центрифугировали при комнатной температуре 12 минут, 14 000 об/мин, для того чтобы гранулы выпали в осадок, после чего переносили супернатант в чистые микроцентрифужные пробирки объемом 2 мкл и добавляли 250 мкл. PPS for Soil Kit(Protein Precipitation Solution), центрифугировали при комнатной температуре 5 минут, 14 000 об/мин. Полученную жидкость переносили в пробирки и добавляли связывающее вещество матрикс(Binding Matrix) в объеме 1 мкл, перемешивали в течении 2 минут и оставляли отстаиваться на 3 минуты. Из каждой пробирки отбирали 500 мкл надосадочной жидкости, добавляли Resuspend Binding Matrix в оставшееся количество супернатанта, затем перемешивали и отбирали около 600 мкл. полученной жидкости, для добавления в пробирку с фильтром, центрифугировали при комнатной температуре 1 минуту, 14000 об/мин. Надосадочную жидкость выливали, полученный белый осадок оставляли на фильтре. Данную процедуру проводили до того момента пока не отфильтровали все из пробирок. После того как на фильтре остался белый осадок добавляли 500 мл. Concentrated SEWS-M и центрифугировали 1 мин для того, чтобы произвести очистку препарат от белков. После чего переносили фильтр в другую пробирку для проверки отсутствия жидкости в препарате, центрифугировали 1 мин. Полученное вещество сушили на

воздухе в течение 5 минут, после чего добавляли 100 мкл. DSE в контейнер и центрифугировали 1,5 минуты. В результате работы получили чистую от примесей ДНК.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

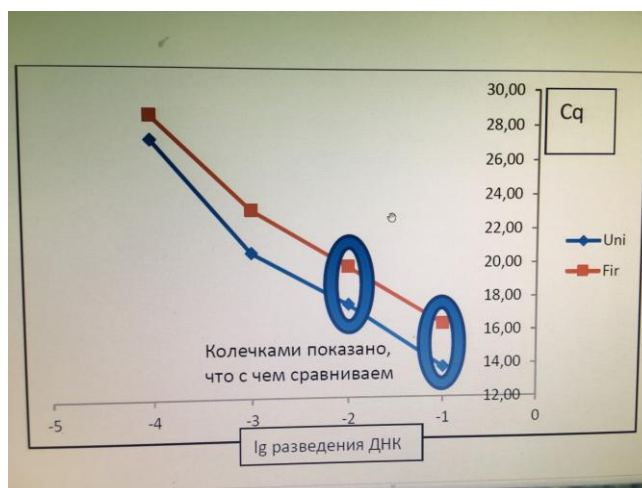


Рис. 1 Процентность фирмикут

Содержания фирмикут в субстрате составило 54%

Фирмикуты — тип бактерий, представители которого характеризуются низким содержанием пар нуклеотидов Г—Ц (меньше 50 %) и строением клеточной стенки, характерным для грамположительных бактерий.

К представителям относят как патогенных для человека и животных организмов (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*), так и представителей нормальной микробиоты человека (представители рода Лактобациллы (*Lactobacillus*)), а также важные промышленные микроорганизмы (молочнокислые бактерии, *Paenibacillus polymyxa* — продуцент полипептидного антибиотика полимиксина, представители рода Клостридии (*Clostridium*) — возбудители ацетонобутилового брожения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время для обнаружения и идентификации микроорганизмов в различных объектах исследования успешно применяются методы молекулярной биологии в частности полимеразная цепная реакция. Данные методы имеют ряд преимуществ по отношению к классическим методам микробиологии, так как позволяют проводить идентификацию микроорганизмов с высокой специфичностью в присутствии сопутствующей микрофлоры и чувствительностью до единичных клеток.

В результате выполненной работы получен чистый препарат суммарной микробной ДНК из отходов сельскохозяйственных производств.

В процессе исследования были решены следующие задачи:

1. Апробирована выбранная методика получения суммарной микробной ДНК из сельскохозяйственных отходов, которые используются на биогазовой станции «Лучки» в зимнее время года.

2. Процент содержания фирмикут в полученных образцах составляет 54%.

3. Разработаны методические рекомендации для бакалавров и магистрантов кафедры биотехнологии и микробиологии по получению препаратов суммарной микробной ДНК из отходов сельского хозяйства (Приложение 1), которые смогут адаптировать на региональном сырье.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амерханов, Р. А. Оптимизация сельскохозяйственных энергетических установок с использованием возобновляемых видов энергии. / Р. А. Архемахов – М.: Колос. 2000. С. 159-238.
2. Благутина, В. В. Биоресурсы // Химия и жизнь – 2007. – №1. – С. 36-39
3. Баадер, В. Биогаз: теория и практика / В. Баадер, Е. Доне. – М.: Колос, 2002. – 184 с.
4. Белгородский институт альтернативной энергетики. – 2013. – Режим доступа: <http://www.altenergo-nii.ru>.
5. Бикбулатова, С. М., Чемерис, Д. А., Никонов, Ю. М., Машков, О. И., Гарафутдинов, Р. Р., Чемерис, А. В., Вахитов, В. А. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // вестник Башкирского университета. – 2012. – Т.17,№. – С.59-67.
6. Вандышева, М. С. Биогаз – альтернативный источник энергии // Вестник НГИЭИ – 2014, №6 (37) – С. 22-26.
7. Великов, В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство: Учебное пособие для студентов биологического факультета и факультета нано- и биомедицинских технологий / В. А. Великов. – Саратов: Саратовский источник, 2013. – 84 с.
8. Владимирова, А. Ф. Состояние и тенденции развития энергетики в мире // Вестник Университета. – 2013, № 23 – С.10–13.
9. Войнов, Н. А., Волова, Т. Г., Зобова, Н. В., Маркова, С. В., Франк, Л. А. Современные проблемы и методы биотехнологии / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова, С. В. Маркова, Л. А. Франк. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009 – С. 8-16.
10. Германович, В., Турилин, А. Альтернативные источники энергии и энергосбережение. Практические конструкции по использованию энергии

ветра, солнца, воды, земли, биомассы / В. Германович, А. Турилин. – СПб.: Наука и техника, 2014 – 320с.

11. Грачев, М. А., Кузнецова, С. Ю., Щербакова, Т. А. Метод выделения высокоочищенной ДНК для использования в полимеразной цепной реакции // Молекулярная биология – 2006 – Т.40, № 1 – С. 180-183.

12. Жиленкова, Ю. И., Филомоненкова, А. С. Методы выделения ДНК // Актуальные проблемы медицины XXI века: сборник статей Международной научно - практической конференции. – Уфа: Аэтерна, 2014 – С. 18–20.

13. Запороженко, Е. В., Слободова, Н. В., Булыгина, Е. С., Кравченко, И. К., Кузнецов, Б. Б. Экспресс-метод выделения ДНК из бактериальных сообществ различных почв // Микробиология. – 2006. – Т.75, №1. – С.127-134.

14. Зебзеев, Г. З. Биогаз как возобновляемый энергоресурс агропромышленных технологий // Наука. Технологии. Инновации. – Новосибирск: Новосибирский государственный технический университет, 2017 – С. 203-206.

15. Касьянов, Г.И., Запорожский, А.А. Хранение и переработка сельхоз сырья // Научно-технический и производственный журнал. – 2008. – № 8. – С. 24-26.

16. Кирюшатов, А.И. Использование нетрадиционных возобновляющихся источников энергии в сельскохозяйственном производстве. / Кирюшатов А. И. – М.: Агропромиздат, 1991. – 96 с.

17. Кузнецов, Т. А. Птицеводческое хозяйство. Птицефабрика. // Научно-технический и производственный журнал. – 2011. – №3. – С. 52 – 53.

18. Нетрусов, А. И., Бонч-Осмоловская, Е. А., Горленко, В. М. Экология микроорганизмов./ А. И. Нетрусов, Е. А. Бонч-Осмоловская, В. М. Горленко. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.

19. Нетрусов, А. И., Котова, И. Б. Микробиология 3-е изд., испр./ А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М.: Академия, 2009. – 352 с.
20. Малофеев, В. М. Биотехнология и охрана окружающей среды: Учебное пособие. /В. М. Мариенко. – М.: Издательство Арктос, 1998. – 188 с.
21. Мариненко Е. Е. Основы получения и использования биотоплива для решения вопросов энергосбережения и охраны окружающей среды в жилищно-коммунальном и сельском хозяйстве: Учебное пособие /Е.Е. Мариенко. – Волгоград: ВолгГАСА, 2003. – 100 с.
22. Опыт Белгородской области: биогаз и биоудобрения. – 2015. – Режим доступа: http://rmrl.ru/blog/post_65.
23. Панцхава, Е. С. Биоэнергетика мир и Россия. Биогаз: теория и практика. / Е. С. Панцхава. – М.: «Русайнс», 2014. – 972с.
24. Панцхава, Е.С., Кошкин, Н.Л., Пожарное, В.А. Биомасса — реальный источник коммерческих топлив и энергии. // Теплоэнергетика. — 2001. — №2. — С. 21-25
25. Развитие отраслей животноводства Белгородской области. – 2018 – Режим доступа: <https://belapk.ru/press-centr/novosti/proshlo-soveshanie-po-razvitiyu-otraslej-zhivotnov>.
26. Ребриков, Д. В. ПЦР « в реальном времени» / Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов, П. А. Семёнов, А. М. Савилова, И. А. Кофиади, Д. Д. Абрамов. – М: Бином, Лаборатория знаний, 2009. – 215с.
27. Рогатых, С. В., Докшукина, А. А., Хайнасова, Т. С., Мурадов, С. В., Кофиади, И. А. Использование технологии ПЦР в реальном времени для оценки эффективности методов выделения ДНК из культур ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47.,№2. – С. 226-230.
28. Стребков Д. С., Ковалев А.А. Биогазовые установки для обработки отходов животноводства. // Техника и оборудование для села – 2006. - №11. – С.28-30.

29. Столповская, Е. Биогаз и биогазовые станции. Анализ и реализованные проекты / Е. Столповская // Сельское хозяйство. – 2013. – Режим доступа: <http://portal-energo.ru/articles/details/id/700>
30. Чумаков, А. Н. Альтернативная энергетика России: потенциал и перспективы освоения. // Вестник экологического образования в России – 2010. – №2 – С.18-20.
31. Шигапов, И. И. Торговля энергоносителями // Современное развитие экономических и правовых отношений. Образование и образовательная деятельность. – 2014. – №1 – С. 415-421.
32. Эффективные технологии утилизации органических отходов // Рынок АПК – 2015. Режим доступа: <https://rynok-apk.ru/magazine/>.
33. De Gregoris, T. B., Aldred, N., Clare, A. S., Burgess, J. G. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa //Journal of Microbiological Methods – 2011 – №. 86. – P. 351–356.
34. Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., Wang, K. Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs // 2008, Letters in Applied Microbiology. –2008 – № 47 – P. 367–373.
35. Klintschar, M., Neuhuber, F. Evaluation of an Alkaline Lysis Method for the Extraction of DNA from Whole Blood and Forensic Stains for STR Analysis // J. Forensic Sci. –2000. – №. 45. – P. 669–673.
36. Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K., et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity // ISME J. – 2007 – № 1(4). – P.283- 290.
37. Piterina, A. V., Bartlett, J., Pembroke, J. T. Molecular analysis of bacterial community DNA in sludge undergoing autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD): pitfalls and improved methodology to enhance diversity recovery // Diversity. – 2010. – № 2. – P.505-526.

38. Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1990. – Vol.56, № 3. – P. 782-787
39. Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R. A., Ovreas, L. Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments // *J. Biotechnol.* – 1998. – №.64. – P.53–62.
40. Tiedje, J. M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T. L., Flynn, S.J., Opening the black box of soil microbial diversity // *Appl. Soil Ecol.* – 1999. – № 13. – P.109– 122.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Методические рекомендации для проведения лабораторных занятий
для бакалавров и магистрантов кафедры биотехнологии и
микробиологии по получению препаратов суммарной микробной ДНК из
отходов сельского хозяйства

Тема: получение препаратов суммарной микробной ДНК из отходов
сельского хозяйства.

План

1. Изучение методики получения препаратов суммарной микробной ДНК из отходов сельского хозяйства;
2. .Отработка методики получения препаратов суммарной микробной ДНК из отходов сельского хозяйства.

Материалы и оборудование

1. Набор реактивов FastDNA фирмы MP Biomedicals
2. Пробирки;
3. Пипетка
4. Центрифуга.

Основные сведения

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным (основным) этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. При наличии выделенной ДНК, далее становятся возможными ее амплификация (с помощью полимеразной цепной реакции – ПЦР), определение последовательности (секвенирование), рестрикционный анализ, клонирование, гибридизация.

Все живые организмы делятся на про- и эукариот. В клетках бактерий, как правило, существует одна кольцевая хромосома размером от 0.4 до нескольких десятков миллионов пар оснований, упаковка которой

достигается за счет суперскрученности. Дополнительно к ней в бактериях встречаются небольшие кольцевые молекулы ДНК – плазмиды. Количество их копий может варьировать от 1 (низкокопийные) до нескольких тысяч (мультикопийные) на клетку. У эукариот геном представлен несколькими линейными молекулами ДНК, которые упаковываются с помощью гистоновых белков.

В общем случае, для выделения ДНК клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а ДНК очистить от других клеточных компонентов. В случае эукариот, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить её целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

- 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом);
- 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;
- 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл.

После чего происходит осаждение ДНК из раствора этанолом и центрифугирование. Затем растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы.

Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия или хаотропный агент гуанидинизотиоцианат. Если нет необходимости в длинных целых фрагментах ДНК, клетки можно разрушить механическим способом путем перетирания со стеклом или речным песком в жидком азоте. Ряд современных методов предусматривает

сорбцию ДНК на гранулах силикагеля в присутствии хаотропных веществ, центрифугирование и последующую элюцию ДНК с гранул в раствор.

Некоторые фирмы продают наборы реактивов для выделения ДНК с использованием магнитных частиц, покрытых силикой SiO₂. Некоторые коммерческие наборы предусматривают сорбцию ДНК на мембранах или ионообменных сорбентах.

ХОД РАБОТЫ

1. Взять пробу, исследуемого образца, в объеме 500 мкл и поместить в 2 микроцентрифужные пробирки, в которые добавить лизирующий раствор;
2. добавить Sodium Phosphate в объеме 978 мкл и 122 мкл MT Duffer;
3. полученную смесь взбить в течение 4-5 минут, для того чтобы разрушить поверхность клетки;
4. микроцентрифужные пробирки со смесью поместить в центрифугу и центрифугировать при комнатной температуре 12 минут, 14 000 об/мин, для того чтобы гранулы выпали в осадок;
5. после центрифугирования перенести супернатант в чистые микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл и добавить 250 мкл. PPS for Soil Kit(Protein Precipitation Solution);
6. поместить в центрифугу и центрифугировать при комнатной температуре 5 минут, 14 000 об/мин;
7. полученную жидкость перенести в пробирки и добавить связывающее вещество матрикс (Binding Matrix) в объеме 1 мкл, перемешать в течении 2 минут и оставить отстаиваться на 3 минуты;
8. из каждой пробирки отобрать пипеткой с дозатором 500 мкл надосадочной жидкости;
9. добавить Resuspend Binding Matrix в оставшееся количество супернатанта;

10. полученную смесь перемешать, отобрать около 600 мкл. полученной жидкости добавить в пробирки с фильтром;

11. центрифугировать при комнатной температуре 1 минуту, 14000 об/мин;

12. надосадочную жидкость отобрать пипеткой с дозатором, полученный белый осадок оставить на фильтре;

Данную процедуру необходимо проводить до того момента пока не отфильтруется все из пробирок.

13. После того как на фильтре остался белый осадок добавить 500 мл. Concentrated SEWS-M;

14. центрифугировать 1 мин для того, чтобы произвести очистку препарат от белков;

15. перенести фильтр в другую пробирку для проверки отсутствия жидкости в препарате, и центрифугируем 1 минуту;

16. полученное вещество высушить на воздухе в течение 5 минут, после чего добаить 100 мкл. DSE в контейнер и центрифугировать 1,5 минуты.

В результате работы получается чистая ДНК, которая не содержит примесей.