

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

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Кафедра биотехнологии и микробиологии

**ПОДБОР И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ СУММАРНОЙ
МИКРОБНОЙ ДНК ИЗ СБРАЖИВАЕМОЙ МАССЫ БИОГАЗОВЫХ
ПРОИЗВОДСТВ**

Магистерская диссертация
студентки очной формы обучения
направления подготовки 06.04.01 Биология
магистерская программа Микробиология
2 курса обучения группы 07001643
Сорокиной Елены Федоровны

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

Рецензент:
Начальник лабораторной
биогазовой установки
ООО «АльтЭнерго»
Охримчук Д.П.

БЕЛГОРОД 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	7
1.1. Проблема исчерпаемости традиционных энергоресурсов.....	7
1.2. Энергоресурсы и виды энергоносителей.....	10
1.3. Структура производства электроэнергии.....	13
1.4. Распространение основных отраслей альтернативной энергетики в мире и в стране.....	14
1.5. Биогазовые технологии и их связь с сельскохозяйственной отраслью.....	18
1.6. Развитие животноводства в Белгородской области.....	20
1.7. Технологии получения биогаза, применяемые в Белгородской области.....	23
1.8. Генетические методы исследования микробиологических сообществ.....	28
1.9. Полимеразная цепная реакция в реальном времени как высокотехнологичный аналитический метод.....	32
1.10. Изучение микробного сообщества биогазовой станции "Лучки".....	35
ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ.....	38
2.1. Методы выделения ДНК.....	38
2.1.1. Выделение ДНК методом фенольной экстракции.....	36
2.1.2. Выделение ДНК методом щелочного лизиса.....	38
2.1.3. Выделение ДНК с использованием магнитных частиц.....	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	42
3.1. Сравнение результатов применения различных методов выделения ДНК для получения препаратов суммарной геномной ДНК микробного сообщества промышленного биогазового реактора.....	42

3.2. Проверка отсутствия ингибиторов ДНК-полимеразы в полученных образцах ДНК.....	43
3.3.Обсуждение результатов.....	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	49
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	51
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	60

ВВЕДЕНИЕ

На данный момент во всем мире остро стоит вопрос нехватки энергоресурсов, борьба за которые является одним из факторов, существенно влияющих на направления развития мировых экономических отношений и глобальной политики в целом. В сложившейся ситуации способы получения энергии при помощи переработки возобновляемых источников энергии выходят на первое место.

Виды топлива, которые в настоящее время относят к нетрадиционным источникам энергии, были известны уже давно, но не используются по различным причинам. В связи с тем, что на данный момент в мире происходит постоянное повышение цен на нефть и природный газ, одним из преимуществ нетрадиционных источников энергии является относительно низкая стоимость. Четвертый этап технической революции связан с развитием технологий, основанных на применении нетрадиционных источников энергии, в частности биогаза.

Выработка биогаза является экономически эффективным способом утилизации органических отходов и получает всё большее распространение. Оптимизация этой технологии и контроль за процессом анаэробного сбраживания органических веществ требует оперативного получения данных о состоянии микробного сообщества, осуществляющего этот процесс.

Изучение сообществ микроорганизмов, обеспечивающих выработку биогаза, ведётся как традиционными методами микробиологии, так и современными молекулярными методами.

Актуальность исследований описанной проблемы связана с необходимостью дальнейшей оптимизации технологии переработки органических отходов методом анаэробного сбраживания, а также необходимостью разработки эффективной методики таксономического анализа

сложных микробных сообществ в интересах биотехнологии, коммунального хозяйства, прикладных исследований в области медицины и ветеринарии.

В настоящее время важнейшей проблемой является получение возможности проведения качественного и количественного анализа микробных сообществ, обеспечивающих разложение широкого спектра органических отходов, применяемых для производства биогаза, а также собственно выработку компонентов биогаза в отдельности из продуктов их разложения.

Особый интерес представляет детекция и количественная оценка различных таксонов эвриархеот, использующих для выработки метана различные исходные соединения. Важнейшим диагностическим признаком сбалансированности и, как следствие, эффективности работы сообщества является количественное соотношение эубактериальных и археобактериальных таксонов. Для разработки и оптимизации методики, позволяющей получать эти и многие другие данные о течении процесса необходимо углубленное исследование применимости и функциональных ограничений различных подходов к выделению геномной ДНК из субстратов, применяемых для выработки биогаза, в том числе с применением современных методов анализа. При этом соблюдаются два основных требования: сохранность выделяемого генетического материала микробного сообщества, позволяющая эффективно использовать его в качестве матрицы для проведения ПЦР и отсутствие примесей, способных ингибировать реакцию и приводящих к существенному снижению её эффективности.

В связи с этим, целью данного исследования явился подбор и оптимизация методики выделения суммарной микробной ДНК из сброживаемой массы биогазового реактора.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выделить суммарную микробную ДНК тремя различными методами, известными в настоящее время.

2. Провести сравнительный анализ полученных препаратов для определения наиболее эффективного метода выделения ДНК из сбраживаемой массы.

3. Проверить применимость полученного препарата ДНК для анализа методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Объектами исследования являлись сбраживаемая масса биогазовых производств и выделяемая из неё суммарная ДНК обитающих в ней микроорганизмов, предметом исследования – методики выделения ДНК и пригодность полученных препаратов для анализа молекулярными методами.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Проблема исчерпаемости традиционных энергоресурсов

В настоящее время население земного шара близко к экологической катастрофе, потому что мировые запасы природных ресурсов превышают на треть от того, что может дать планета Земля.

На данный момент в мире действует закон ограниченности всех природных ресурсов.

К природным ресурсам относят объекты и явления природы, используемые для удовлетворения материальных, культурных и научных потребностей человечества, они делятся на две группы исчерпаемые и неисчерпаемые (рис.1.1.) (Макевнин и др. 2007г.).



Рисунок 1.1. Классификация природных ресурсов

Воздух, вода, сырьевые и энергетические ресурсы – это те ресурсы, без которых человечество не сможет прожить. К энергетическим ресурсам относят запасы ископаемого топлива, такие, как газ, нефть, горючие сланцы, уголь. Минеральное сырье, которое содержит необходимые компоненты для промышленного производства - сырьевые ресурсы (Рябышенков и др., 2017г.).

В процессе развития экономической деятельности государств большинство ресурсов из категории возобновимых переходит в категорию невозобновимых (Владимирова 2013г.). Существует предел истощения для запасов тех или иных видов сырья. Им может быть полное исчерпание запасов или ограничение, которое связано с экологической безопасностью, а так же невозможность для общества платить за данный ресурс высокую цену (Рябышенков и др., 2017г.).

Со второй половины XX века масштабы и темпы добычи минерального сырья (нефти, газа, угля, полезных ископаемых) резко возросли (Быстрицкий 2012). Значительная часть известных на сегодняшний день запасов минеральных ресурсов представлена относительно бедными месторождениями или залегает в сложных условиях. Их разработка требует больших, чем раньше, капиталовложений, более совершенной технологии добычи и переработки. Такими же быстрыми темпами растет потребление электроэнергии. Однако основными источниками на сегодня остаются по-прежнему невозобновимые материальные ресурсы: нефть, уголь, газ, торф, уран (Макевнин 2007г.).

Нефть и газ относятся основными источниками энергии современной технической цивилизации. Три миллиарда тонн нефти в год добывается и используется человеком. Из них один миллиард потребляют США. На одного американца в среднем приходится 10,6 литра нефти в день, при этом он проезжает более тысячи миль в месяц. Импорт нефти в США больше, чем Дании, Финляндии, Франции, Германии, Греции, Италии, Норвегии, Испании и Швеции, вместе взятых. Использование нефти США в полтора раза больше, чем странами Евросоюза и в два раза, чем Японией. Житель Америки

использует горючего в 20-30 раз больше, чем житель любой развивающейся страны (Боровский 2016).

За 150 лет человек израсходовал более 65% мировых запасов нефти. Расход нефти за один день почти в 5 раз больше, чем её нахождение (Быстрицкий 2012).

Пик добычи нефти в США был в 1971 году, в Канаде – в 1974 году, в Индонезии – в 1977 году, в Малайзии – в 1997 году, в Англии – в 1999 году, в Норвегии – в 2001 году. Потребление нефти достигло новой вершины в 2010 году и составило 87,4 миллиона баррелей в день (Владимирова 2013). Нефть является самым значимым коммерческим источником энергии. На сегодняшний день потребление нефти составляет тридцать миллиардов баррелей в день. По прогнозам аналитиков к 2030 году производство нефти упадёт в два раза по сравнению с нынешним. Нефтяная промышленность не обладает гибкостью для поддержания добычи в случае наступления кризиса в экономике (Рябышенков 2017).

Несмотря на то, что прогнозы запасов энергетических ресурсов пессимистичны, в настоящее время успешно разрабатываются новые подходы к решению проблемы энергетического кризиса.

В современном мире внедрение энергосберегающих технологий и альтернативных источников энергии происходит достаточно медленно (Панцхава 2014).

На данный момент мировая общественность готовится к использованию энергии термоядерного синтеза. По прогнозам ученых благополучие развитых стран в сфере энергетики в ближайшее время будет строиться за счет стран, которые добывают нефть, но при этом являются слабыми на экономической арене.

На сегодняшний день точных данных относительно того, на какой срок человечество может считать себя обеспеченным ископаемым топливом и

минеральным сырьем нет. Ясно одно, что запасы природных ресурсов исчерпаемы и невозобновимы (Владимирова 2013).

1.2. Энергоресурсы и виды энергоносителей

Для протекания любого технологического процесса используют энергоносители различного вида (Клавдиенко 2003).

Все виды ресурсов, являющиеся источниками энергии, которую используют в топливной промышленности и применяют для того, чтобы обеспечить работоспособность различных объектов технологического производства, являются энергоносителями. В современном мире идет борьба за природные энергоносители такие как каменный уголь, нефть, природный газ (Мановян 2004).

Любое промышленное предприятие для того, чтобы организовать свою деятельность использует энергоресурсы различных видов, назначения и параметров. Крупные предприятия используют потоки энергоносителей, направление которых связано между собой. Такие типы энергоносителей имеют различные характеристики (Шигапов 2014).

Обеспечение условий для протекания технологического процесса является основной задачей энергоносителей (Голицын 2004).

При выборе энергоносителей внимание обращается на следующие факторы:

1. Условия, при которых протекает технологический процесс;
2. характеристики установленного оборудования;
3. параметры установленного оборудования;
4. параметры энергоносителя;

5. характер обеспечения энергоносителями предприятия (внутреннее или внешнее) (Колокольцев 2015).

При выборе энергоносителей учитывают следующие характеристики:

1. потенциал;
2. параметры (ток, напряжение, температура, давление и т.д.);
3. стоимость;
4. качество;
5. надежность снабжения;
6. режимы потребления (Колокольцев 2015).

Вещества, используемые хозяйственной деятельностью для получения энергии, которая выделяется при сжигании, называются топливом. Тип обработки оказывает огромное влияние на характеристики различных видов топлива (Голицын 2004). Наличие альтернативных видов топлива, к которым относят биогаз, биомассу, водоугольное топливо, производит замену или сокращение потребления традиционных видов топлива (Варфоломеев 2010). Все энергоносители должны быть точно определены в соответствии с принятыми в международном масштабе стандартами.

В качестве энергоносителей используют:

1. дрова;
2. древесный уголь;
3. каменный уголь;
4. бурый уголь;
5. торф;
6. брикетное топливо;
7. кокс каменноугольный;
8. горючий сланец;
9. нефтепродукты;
10. природный газ;
11. жом сахарного тростника;

12. отходы растительного происхождения;
13. отходы животного происхождения (Колокольцев 2015).

Применение энергоносителей в топливной промышленности. Топливо-энергетический комплекс (ТЭК) является сложной системой, которая включает в себя совокупность производств, процессов, материальных устройств по добыче топливно-энергетических ресурсов, и их преобразование, транспортировку, распределение и потребление как первичных топливно-энергетических ресурсов, так и преобразованных видов энергоносителей (Мановян 2004).

В ТЭК входят:

1. нефтяная промышленность;
2. угольная промышленность;
3. газовая промышленность;
4. торфяная промышленность;

Топливно-энергетическая промышленность является базой развития российской экономики, инструментом проведения внутренней и внешней политики, она связана со всей промышленностью страны. На развитие данного вида промышленности в год расходуется более 20% денежных средств, приходится 30% основных фондов и 30% стоимости промышленной продукции Европы (Колокольцев 2015).

Применение энергоносителей в угольной промышленности. Уголь применяется в топливной промышленности с древних времен, так как является основным старейшим источником энергии (Мановян 2004).

Угольная промышленность является частью топливно-энергетической промышленности и включает в себя добычу открытым способом или в шахтах, обогащение и переработку (брикетирование) бурого и каменного угля.

В зависимости от того на какой глубине залегает уголь выбирают способ добычи:

1. открытым способом, если глубина залегания угольного пласта не превышает 100 метров;
2. подземным способом, когда углубление угольного карьера большое (Мановян 2004).

Применение энергоносителей в нефтяной промышленности.

Нефтяная промышленность является частью экономической отрасли, которая занимается добычей, переработкой, транспортировкой, складированием, а также продажей полезного природного ископаемого – нефти и сопутствующих нефтепродуктов. В основе нефтяной промышленности находятся вертикально-интегрированные нефтяные компании (Голицын и др. 2004).

Формирование мировых цен на энергоносители.

На сегодняшний день в мире происходит снижение стоимости энергоносителей, так один баррель нефти стоит в 3 раза меньше по сравнению с 2014 годом (Шигапов 2014).

Ведущей статьей экспорта в Российской Федерации является экспорт энергоносителей. Около 60% объема от общего экспортируемых товаров из России приходится на энергоносители. К основным видам энергоносителей относят нефть и нефтепродукты, природный газ, уголь, ядерное топливо, электроэнергию (Шигапов 2014).

1.3. Структура производства электроэнергии

Электроэнергетика является частью топливно-энергетического комплекса, а также одной из базовых отраслей мирового хозяйства. Это объясняется необходимостью электрификации самых разных сфер человеческой деятельности (Быстрицкий 2012). В связи с этим уровень

электрификации топливно-энергетического баланса мира, измеряемого количеством первичных энергоресурсов, которые расходуются на производство электроэнергии, все время возрастает и в развитых странах уже превысил 2/5 (Владиминова 2013).

Из-за неравномерного распределение ресурсов энергетики во всех странах мира, учитывая техническую и экономическую доступность энергетических источников, происходит построение структуры производства электроэнергии (Быстрицкий 2012). Так, например, в Молдове, Беларуси и Польше около 100% производят на теплоэлектростанциях (ТЭС), в Литве 85% производят на атомных электростанциях (АЭС), 15% – на гидроэлектростанциях (ГЭС) и теплоэлектростанциях. В России 67% электроэнергии производят ТЭС, (АЭС) – 17% и ГЭС – 16%. Нетрадиционные источники энергии производят около 1% энергии (Владиминова 2013).

Электростанции России за 2016 год произвели 1037 млрд. кВт/ч электроэнергии, в сравнении с 2015 годом рост составил 4.4%.

Как правило, большинство стран не учитывают загрязнения окружающей среды, которые наносят электростанции на различных видах топлива, в приоритете находятся не экологические, а экономические факторы (Быстрицкий 2012). В таких странах как Индия, Польша, Китай работа ТЭС осуществляется на угле. На сегодняшний день в мире возрастает количество электроэнергии, полученной за счет возобновляемых источников энергии, и по прогнозам к 2030 году достигнет 20% (Боровский 2017).

1.4. Распространение основных отраслей альтернативной энергетики в мире и в стране

Для того чтобы решить проблемы, которые связаны с энергосбережением как в промышленном масштабе, так и в частном секторе, широко используют альтернативные источники энергии (Боровский 2017).

Альтернативная энергетика включает в себя совокупность перспективных методик получения, передачи, использования источников энергии, которые не так широко распространены, по отношению классическими, но при этом представляют собой интерес, так как их применение является выгодным и риск причинения вреда окружающей среде находится на минимальном уровне (Верещагин 2009).

Альтернативные источники энергии – это возобновляемый ресурс, заменяющий традиционные источники энергии, использующие нефть, добываемый природный газ и уголь, выбрасывающие при сгорании углекислый газ в атмосферу, который вызывает парниковый эффект и глобальное потепление (Торшин и др.2009). Основной причиной поиска альтернативных источников энергии является необходимость получения её из практически неисчерпаемых или возобновляемых природных ресурсов и явлений. Как правило, при выборе альтернативных источников во внимание берется их экологическая чистота и экономическая выгода. В настоящее время существует несколько видов альтернативных источников энергии: солнечная, ветряная, геотермальная, биотопливо (Верещагин 2009).

Эффективность использования различных альтернативных источников энергии, как правило, зависит от региона, в котором эти источники будут применяться (Мариненко 2003). Качественный мониторинг энергопотенциала позволяет определять наиболее подходящую технологию и рассчитывать ее окупаемость на годы вперед, а так же исключает ошибки, связанные с региональными особенностями. Поиски новых источников энергии считаются одним из важнейших требований времени. Ограниченные запасы естественного энергетического сырья: нефти, угля, газа, являющихся на данный момент основными видами топлива, требуют поиска других путей развития энергетики

– более эффективных источников энергии. Главными критериями в определении данных направлений развития энергетики обязаны стать безопасность и экологическая чистота (Вертакова 2017).

На сегодняшний день популярными становятся альтернативные источники энергии, такие как ветряные электростанции (ВЭС), солнечные батареи. Ветряные электростанции – устройства специальной конструкции, в которых энергия ветра преобразуется в электрическую. Для данных электростанций используются природные, а главное, возобновляемые источники энергии. Такие электростанции являются достаточно удобными и простыми в применении, и используются как альтернатива традиционным источникам энергии (Вертакова 2017).

Помимо того, что ВЭС используют для работы бесплатную энергию ветра и не зависят от внешних источников электроэнергии, они обладают и другими преимуществами по отношению к традиционным источникам энергии:

4. отсутствует проблема утилизации и хранения отходов;
 5. способ получения энергии является экологически чистым;
 6. установка может быть как стационарной, так и передвижной
- (Верещагин 2009).

На сегодняшний день ветроэнергетика приобретает огромную популярность в различных странах мира, о чем можно судить по возросшим инвестициям в эту область (Вертакова 217).

По данным WWEA лидером на рынке ветряной энергетики является Китай. В 2017 ветряные установки в этой стране вырабатывали около 67,7 ГВт. На сегодняшний день мощность ветряных установок Китая достигла около 80 ГВт. Традиционные источники энергии не вырабатывают того количества энергии, которое необходимо для удовлетворения всех энергетических запросов, поэтому энергия ветра в этой стране востребована (Вертакова 2017).

По отношению к Китаю Соединенные Штаты находятся на втором месте по суммарной мощности ветроэнергетики. В настоящее время здесь производится около 60 ГВт ветряной энергии.

В настоящее время на европейском рынке ветроэнергии лидером является Германия, которая производит более 30 ГВт энергии ветра.

В Дании количество энергии ветра достигло 28% от всего потребляемого электричества, а к 2020 году этот показатель планируют повысить до 50 процентов. Датчане очень умело интегрируют энергию ветра в свою энергетическую систему. В одном из муниципалитетов электроэнергия более чем на 100 процентов поступает из возобновляемых источников, а весь избыток расходуется на отопление (Вертакова 2017).

На данный момент Россия отстает по отношению к другим странам в развитии ветряной энергетики. В стране построено лишь несколько ветряных электростанций, мощность которых более 1 МВт. Причиной такого отставания является развитие гидроэнергетики и отсутствие условий для эксплуатации промышленных ветроэнергетических станций, но при этом отмечается рост небольших установок, которые способны обеспечивать энергией домохозяйства (Вертакова 2017).

Солнечная энергия, как альтернативный источник энергии, заняла второе место после ветряной энергии (Панцхава 2014). Солнечная энергия используется для отопления и обеспечения зданий горячей водой. Преобразование этого вида энергии в тепловую происходит в гелиосистемах (Голицын и др. 2004).

Солнечная энергетика получает все более широкое распространение в разных странах мира (Владимирова 2013). Причиной более широкого распространения данного вида энергии в последние годы стало:

7. возобновляемый источник энергии;
8. развитие новых технологий, которые позволили снизить стоимость оборудования;

9. чистота производства получаемой энергии («зеленая энергетика») (Варфоломеев 2010).

Германия является мировым лидером по использованию солнечной энергии и выработке электроэнергии на ее базе (Вертакова 2017). К 2050 году эта страна планирует обеспечить свои нужды в электроэнергии на базе одних лишь фотовольтаичных панелей и других солнечных инсталляций на 100% (Верещагин 2009).

Китай по использованию солнечной энергии занимает второе после Германии место. На долю солнечной энергии Китая приходится 14,3% от всей производимой энергии (Вертакова 2017).

Третье место по использованию солнечной энергии находится Италия. На долю общей солнечной энергии приходится 12,5%. За последние года темпы роста использования данного вида альтернативной энергии снизились, но Италия по прежнему остается одним из главных производителей солнечной энергии. С ее помощью обеспечивается 7% населения в электроэнергии (Вертакова 2017).

Россия не является исключением в тенденции развития солнечной энергетики. Потенциалом для развития этого вида альтернативной энергетики обладают южные районы страны – республики Кавказа, Краснодарский и Ставропольский край, южные районы Сибири и Дальнего Востока (Чумаков 2010). Мощность работающих солнечных электростанций на территории России по состоянию на 2017 год составляет 75,2 МВт, в процентах – это 0,03% от мощности электростанции энергетической системы страны (Верещагин 2009).

1.5. Биогазовые технологии и их связь с сельскохозяйственной отраслью

Одной из наиболее перспективных отраслей альтернативной энергетики являются технологии получения биогаза. Они основаны на микробиологических процессах, протекающих в несколько этапов (Вандышева 2014). Исходным сырьём для биогазовой отрасли являются различные источники дешёвых или бросовых органических веществ (Кобезский и др. 2016). На первом этапе эубактерии разлагают биополимеры до мономеров и олигомеров – низкомолекулярных органических соединений. Затем происходит их сбраживание, большей частью до летучих органических кислот – уксусной, масляной, муравьиной. Эти вещества, в свою очередь, используются метаногенными архебактериями для выработки из них метана (Зебзеев 2017).

Источниками органического сырья для биогазовых производств в большинстве случаев являются разнообразные отходы, и как правило, отходы предприятий агропромышленного комплекса (Баадер 2002). В первую очередь это навозные стоки, отходы выработки сахара и растительных масел, зерноотходы, солома, силос, зелёная масса. Также могут использоваться органические вещества сточных вод и бытовой мусор (Садчиков 2017).

В связи с тем, что отходы агропромышленного комплекса выступают основным сырьём для биогазовых производств, происходит тесная взаимосвязь между аграрной и биогазовой отраслью (Мановян 2004). Биогазовая промышленность, в свою очередь, помогает решать проблему накопления сельскохозяйственных отходов, повышает окупаемость сельхозпроизводств за счёт эффективной утилизации их побочных продуктов (Кобезский и др. 2016).

Говоря об актуальности биогазовых технологий в конкретном регионе, необходимо говорить прежде всего о месте биогазовых производств в агропромышленных производственных циклах, и, соответственно, анализировать их состояние и перспективы.

1.6. Развитие животноводства в Белгородской области

Белгородская область является один из лидеров российского агропромышленного комплекса (АПК), производя ежегодно около 4,4% от общероссийского объема валовой сельскохозяйственной продукции. При этом АПК области в индустриальное сельское хозяйство страны составляет около 8% 38 (Опыт Белгородской области...2015).

На сегодняшний день в Белгородской области успешно сформированы технологические базы мясного животноводства.

Основными производителями мяса птицы, которые работают на территории Белгородской области, являются: ЗАО «Приосколье», ООО «Белгранкорм», ЗАО «Белая птица». Так же предприятие ООО «Белгранкорм» выращивает мясо утки – 2,3 тыс. тонн, а ЗАО «Агрофирма «Герцевская» – мясо индейки – в объеме 2,5 тыс. тонн (Развитие отраслей животноводства Белгородской области...2018).

Основными производителями свинины являются ГК «Мираторг», которая на территории региона производит 41,5% от общего объема свинины в области, и ООО «ГК Агро-Белогорье» с производством 22,6% от общего объема (Развитие отраслей животноводства Белгородской области...2018).

Так как в Белгородской области происходит интенсивное развитие птицеводства и животноводства, в результате чего ежегодно образуется свыше 1020 тыс. тонн навоза крупного рогатого скота, 1800 тыс. кубометров свиноводческих стоков, более 1100 тыс. тонн куриного помета, то проблема утилизации отходов этих отраслей является одной из самых актуальных. На данный момент, несмотря на то, что существует разнообразное множество подходов и технологий в области утилизации органических отходов в животноводстве, остается ряд проблем, которые связаны с их рациональной и экологически эффективной переработкой (Опыт Белгородской области...2015).

Навозные стоки, которые получают в процессе жизнедеятельности животных, в дальнейшем используют для обогащения почвы азотом, а так же другими полезными элементами питания. Они являются ценным органическим удобрением, которое содержит фосфор, калий, азот и микроэлементы, большая часть полезных элементов находится в легко растворимой форме и является для почвы легко усвояемым продуктом (Стребков 2006). Утилизация навозных стоков направлена на создание безотходной технологии, предотвращение загрязнения окружающей среды, получения дополнительной сельскохозяйственной продукции и снижение затрат на приобретение минеральных удобрений (Мариненко 2003).

Одной из основных и осязаемых проблем является распространение неприятных зловонных запахов от животноводческих объектов на этапах накопления, хранения и внесения жидкого навоза. Данная проблема является актуальной для жителей населенных пунктов, которые находятся вблизи объектов животноводства, в течение всего времени года и особо обостряется в весенне-осенний период внесения навоза на поля. Учитывая, тот факт, что зона распространения неприятных запахов может достигать по радиусу до 5 км для ряда сельскохозяйственных регионов с высокоразвитым уровнем промышленного животноводства, данная проблема носит массовый характер (Стребков 2006).

Почва содержит множество клеток живых микроорганизмов (бактерий, грибов, дрожжей), которые являются естественными утилизаторами неживого органического вещества (Нетрусов и др. 2009). Отходы живых организмов, отмершие растения, для данных микроорганизмов являются источниками энергии жизнедеятельности. В процессе жизнедеятельности этих микроорганизмов происходят процессы самоочищения и самовосстановления экосистемы. Таким образом, используя сапрофитные микроорганизмы, можно справиться с интенсивным органическим загрязнением (Сазыкин и др. 2008). Работа в данном направлении осуществляется путем выделения из почвы

естественных микроорганизмов, которые являются наиболее гигиенически и экологически эффективные для утилизации специфических органических субстратов по показателям:

1. скорость сокращения массы отходов окисления;
2. эффективность использования соединений азота и фосфора;
3. скорость ускорения отмирания гнилостных условно патогенных и патогенных микроорганизмов;
4. скорость снижения количества дурно-пахнущей летучей органики.

Составленное таким образом сообщество микроорганизмов способно заменить процессы восстановления процессами окисления и брожения в местах массового скопления навозных стоков и отходов (Добровольская 2001).

В настоящее время существует множество микробиологических препаратов, которые применяют для устранения неприятных запахов от лагун навозонакопителей.

Например, биологически активная добавка (БАД) «Санвит», которая является комплексным биопрепаратом. Санвит содержит консорциум полезных микроорганизмов, ферментов, органических кислот и других биологически активных веществ. Данный препарат улучшает качество воздуха, уменьшая концентрацию аммиака и других вредных газов, тем самым создавая более комфортные условия. В результате действия этого препарата исчезает «шапка» органического материала над жидкой фазой в лагуне, происходит гомогенизация стока за счет образования суспензии микроорганизмов и отсутствия монолитного придонного осадка, что позволяет легко освобождать лагуны и избегать загазованности полей при шланговом внесении животноводческих стоков (Эффективные технологии...2015).

Препарат «ТАМИР» включает в себя совокупность микроорганизмов *Lactobacillus casei* 21, *Streptococcus lactis* 47, *Rhodopseudomonas palustris* 108, *Saccharomyces cerevisiae* 76, культуральную жидкость, ферменты и метаболиты, которые способствуют более активному разложению продуктов метаболизма

животных естественным путем за короткий промежуток времени. Штаммы микроорганизмов, которые входят в состав препарата не обладают вирулентностью, токсичностью и токсигенностью, они не являются патогенными, квалифицируются как «промышленные микроорганизмы». Данный препарат предназначен для обработки бытовых и промышленных отходов, ликвидации запахов и санации канализационных вод и очистки сточных вод ферм и свиноводческих комплексов (Эффективные технологии...2015).

Использование данных микробиологических препаратов способствует сокращению количества выбросов аммиака и сероводорода, а так же происходит улучшение микробиологических показателей в лагунах.

1.7. Технологии получения биогаза, применяемые в Белгородской области

Несмотря на то, что животноводческие стоки и куриный помет являются результативными органическими удобрениями, внесение которых в почву помогает возвращению в нее части органического вещества, их необходимо предварительно обрабатывать микробиологическими препаратами (Пискаева 2016), что не всегда является рентабельным. Поэтому в области нашли способы не только утилизировать отходы, но и получать из них максимальную выгоду. Так в настоящее время в Белгородской области органические отходы применяют для производства биогаза (Белгородский институт альтернативной энергетики 2013).

Биогазом является горючая смесь газов, которую получают в результате разложения органических субстанций в процессе анаэробного брожения. На выходе из реактора получают уже готовые к использованию органические удобрения (жидкие и твердые) (Панцхава 2014). Для эффективного

производства биогаза из органического сырья создаются комфортные условия для жизнедеятельности целого комплекса видов бактерий и архей при отсутствии доступа кислорода (Садчиков 2017).

Сырьем для получения биогаза может служить широкий спектр органических отходов: твердые и жидкие отходы агропромышленного комплекса, сточные воды, твердые бытовые отходы, отходы лесопромышленного комплекса, однако наиболее эффективно использование отходов животноводческих и птицеводческих ферм, предприятий АПК и сточных вод (Панцхава 2014).

На сегодняшний день в мире используется или разрабатывается около 60-ти различных технологий получения биогаза (Садчиков 2017). В основном технология получения биогаза связана с интенсивным разложением органики с помощью ферментов в специальных условиях (соответствующие температурный и кислотный (pH) режимы, давление и другие необходимые условия). Наиболее распространённый метод – это «метановое сбраживание» в анаэробных (без доступа воздуха) условиях (Васильева 2018).

«Метановое сбраживание» происходит при разложении органических веществ в результате жизнедеятельности двух основных групп микроорганизмов (табл. 1) (Баадер 2002).

Таблица 1.1.

Этапы процесса брожения биомассы

	Процесс	Бактерии	Выход
I	Гидролиз	Аэробные гидролизные бактерии	Моносахариды, аминокислоты и жирные кислоты
II	Повышение кислотности	Кислотообразующие бактерии	Органические кислоты, двуокись углерода
III	Образование уксусной кислоты	Бактерии, образующие уксусную кислоту	Уксусная кислота, двуокись углерода, водород
IV	Образование метана	Метановые археобактерии	Метан, двуокись углерода, вода

Первая группа – это микроорганизмы, которые расщепляют сложные органические соединения (клетчатку, белки, жиры) до более простых соединений, при этом в сбраживаемой среде появляются первичные продукты брожения – летучие жирные кислоты, низшие спирты, оксид углерода, водород, муравьиная и уксусная кислоты. Данные соединения являются источником питания для второй группы микроорганизмов – метанообразующих археобактерий, превращающих органические кислоты в метан, углекислый газ и так далее. Интенсивность газовыделения зависит от условий, создаваемых для жизнедеятельности метанообразующих археобактерий (Баадер 2002).

Микроорганизмы перерабатывают биомассу в метан при температуре от 25 до 70°C. Часть энергии, которая образуется в результате утилизации биогаза, направляется на поддержание процесса (в зимнее время до 15–20%), в странах с жарким климатом подогревать метантенк нет необходимости (Шейна и др. 2009).

Биогаз образуется при метановом сбраживании и представляет собой смесь, которая состоит из 50-80% метана, 20-25% углекислого газа, примерно 1% сероводорода и незначительного количества примесей других газов (Садчиков 2017).

Жидкие и твёрдые отходы, поступающие в метантенк (анаэробная колонна), сбраживаются и перемешиваются, в результате чего на выходе получается биоудобрение и биогаз. Далее биогаз поступает в газгольдеры, очищается и хранится; для дальнейшего использования он поступает в когенерационный блок биогазовой установки, который вырабатывает электроэнергию и тепло. Таким образом, биогазовая установка позволяет создать замкнутое производство, которое является безотходным и обеспечивает стабильный доход (Стребков 2006). В результате данного технологического процесса происходит образование биогаза и биологического удобрения.

Количество получаемого биогаза зависит от состава субстрата и содержания в нем органических веществ. В среднем из 1 м³ биогаза

производится от 2 до 4 кВт электроэнергии. Если в дальнейшем произвести очистку биогаза, то из него можно получить биометан, который в свою очередь является аналогом природного газа (Зебзеев 2017).

При помощи биогазовых установок решается проблема сокращения выбросов парниковых газов (Боровский 2016). По оценке специалистов отходов животноводства и птицеводства области для производства биогаза более чем достаточно, что позволит обеспечить производства и всю инфраструктуру птицеводческих и животноводческих комплексов региона энергией и теплом, а также получить собственные высококачественные органические удобрения, которые способны будут восстанавливать урожайность почвы и обеспечивать получение высокого и стабильного урожая (Столповская 2013).

В соответствии с «Концепцией развития биоэнергетики и биотехнологий в Белгородской области на 2009 – 2012 годы», и целевой долгосрочной программы «Энергосбережение и повышение энергетической эффективности Белгородской области на 2010 – 2015 годы и целевые показатели на период до 2020 года» при поддержке правительства области в Прохоровском районе Белгородской области была построена станция «Лучки» по производству биогаза (рис. 1.2.), мощность которой 2,4 МВт.



Рис. 1.2. Биогазовая станция «Лучки»

Данная биогазовая станция является крупнейшей промышленной установкой нашей страны. За год биогазовая станция:

1. перерабатывает более 70 тыс. тонн сырья;
2. производит 66,8 тыс. м³ биоудобрений;
3. производит 19,6 млн. кВт/ч электрической энергии;
4. производит 18,2 тыс. Гкал тепловой энергии (Белгородский институт альтернативной энергетики 2013).

Биогазовая станция «Лучки» была построена компанией «АльтЭнерго» в Прохоровском районе Белгородской области, рядом с 19 объектами основных поставщиков сырья (стоков, отходов животноводства) для выработки биогаза: ООО «МПЗ Агро-Белогорье», ООО «Селекционно-генетический центр» (Белгородский институт альтернативной энергетики 2013).

Биогазовая установка «Лучки» занимается получением биогаза и органических удобрений из отходов агропромышленного комплекса в результате их переработки. Из самого биогаза непосредственно вырабатываются тепловая и электрическая энергия. Каждый день примерно из 200 тонн отходов вырабатывается около 57 тысяч киловатт-часов электроэнергии. Такого объема электроэнергии хватает для того, чтобы обеспечить суточные нужды жителей всего Прохоровского района, в котором находится биогазовая установка.

Часть произведенной «зеленой» энергии передается в электросеть потребителям региона. Небольшое количество энергии расходуется компанией для удовлетворения своих потребностей. Так, например, на «зеленой» энергии работает первая в области зарядная станция для электромобилей, которая расположена в Прохоровском районе. Расход тепловой энергии идет на отопление собственного реактора установки и производственных помещений (Белгородский институт альтернативной энергетики 2013).

На сегодняшний день рынок биогаза наиболее развит в Евросоюзе, он составляет около 3-4% всей потребляемой энергии и оценивается в 2 миллиарда

долларов США, но по прогнозам его рост увеличится до 20 миллиардов долларов США в течении ближайших восьми лет. В странах, которые поощряют использование энергии биомассы на государственном уровне (Финляндия, Швеция и Австрия), доля энергии биомассы достигает от 15 до 20% от всей потребляемой энергии. В Евросоюзе использование биогазовых установок в основном сосредоточено в Австрии, Финляндии, Германии, Дании и Великобритании. В Германии на сегодняшний день насчитывается около двух тысяч больших установок анаэробного сбраживания. В Австрии количество биогазовых установок с объемами реакторов более 2000 м³ составляет в настоящее время более 120 (Вертакова 2017).

Среди наиболее развитых стран лидером по использованию биогазовых установок на сегодняшний день является Китай, где на постоянной основе работает более 20 миллионов установок, которые размещены на свалках отходов и в системах канализации, 12 миллионов из которых используются для получения энергии для освещения, обогрева и приготовления пищи. Эксперты считают, что Китай при условии сохранения темпов роста рынка биогазовых установок станет мировым лидером в этом направлении к 2020 году (Вертакова 2017).

1.8. Генетические методы исследования микробиологических сообществ

Генетический метод исследования внедрён в практику микробиологических исследований относительно недавно (Антонова 2010). Привлечение микроорганизмов в качестве объектов генетических исследований открыло новую эпоху не только в генетике, но и в биологии вообще (Бражникова 2012). Использование молекулярно-биологических методов в

микробиологии расширило возможности исследований и привело к формированию нескольких направлений в систематике микроорганизмов:

- создание филогенетической систематики микроорганизмов;
- идентификация штаммов с использованием филогенетической и фенотипической информации;
- выявление микроорганизмов окружающей среды без их культивирования (Великов 2013).

Применение молекулярно-биологических методов в микробиологии дало возможность более глубокого изучения микробных сообществ (Бражникова 2012). Данные методы позволяют идентифицировать и определять разнообразие микроорганизмов в различных средах, включая и организмы, которые не поддаются изучению при помощи традиционных микробиологических методов (так называемые «некультивируемые формы») (Moss и др. 2003). Отпадает необходимость использования трудоемких процедур посева, культивирования и выделения чистых культур микроорганизмов. Отсутствие стадии культивирования при таких подходах позволяет более полно оценить разнообразие микроорганизмов в окружающей среде. Кроме того, становится возможным изучать изменения состава почвенных микробных сообществ под воздействием различных факторов, идентифицировать отдельные природные микробные популяции или функциональные свойства сообществ, а также проводить мониторинг микроорганизмов, выделенных из сообществ (Запороженко и др. 2006), (Roesch и др 2007), (Piterina и др. 2010).

Наиболее часто в последнее время в микробной экологии применяются следующие молекулярные методы исследования микробных сообществ почвы:

- изучение экстрактов ДНК из твердых субстратов (таких как почва) при помощи метода реассоциации;

- изучение бактериальных популяций *in situ* методом гибридизации с олигонуклеотидными маркерами (ДНК- и РНК- зондами), мечеными флуоресцентными красителями;
- изучение экстрактов ДНК из исследуемого субстрата методом дифференциального центрифугирования в градиенте CsCl;
- методы, основанные на исследовании при помощи полимеразной цепной реакции (Добровольская и др. 2001), (Stadler и др. 2004).

Метод изучения экстрактов ДНК при помощи метода реассоциации связан с определением скорости реассоциации ДНК. Впервые он был применен для характеристики бактериального разнообразия сообществ почв осадков. Данный метод основан на связи гетерогенности препарата бактериальной ДНК со скоростью ее реассоциации. Процесс реассоциации выделенной и расплавленной ДНК исследуют спектрофотометрически в стандартном солевом растворе, используя геном *Escherichia coli* в качестве эталона. По мнению Торсвика, константа реассоциации является идеальной количественной характеристикой, выражающей количество пар оснований в негомологичной ДНК. Она эквивалентна размеру генома в целом и может быть использована для характеристики разнообразия бактериальных сообществ, а также происходящих в них изменений, связанных с природными и антропогенными воздействиями (Boom и др. 1990), (Torsvik и др. 1990а, 1998б).

В мировой практике исследования ранее неизвестных сообществ микроорганизмов для выявления таксономического состава применяется метод, основанный на изучении генов наиболее эволюционно стабильной 16S рРНК бактерий. Изучение бактериальных популяций *in situ* методом гибридизации с олигонуклеотидными маркерами (ДНК- и РНК-зондами), мечеными флуоресцентными красителями позволяет получить количественную информацию о метаболически активных или численно доминирующих популяциях в исследуемом субстрате. Он позволяет оценить относительное количество популяций, принадлежащих к определенным таксонам, на

основании специфического связывания последовательностей 16S (реже 23S) рРНК со специально подобранными олигонуклеотидными маркерами (зондами), сконструированными на основании информации, полученной из базы данных. Фрагмент рРНК внутри клетки искомого бактериального таксона выступает в качестве мишени, с которой специфически связывается олигонуклеотидный маркер с присоединенным флуоресцентным красителем, что позволяет легко диагностировать искомые клетки при просмотре препарата под микроскопом при освещении светом определенного диапазона длин волн, вызывающим специфическое свечение красителя (Войнов и др. 2009).

Метод исследования экстрактов ДНК сводится к экстракции ДНК из почвы с ее дальнейшей очисткой и центрифугированием в предварительно созданном градиенте CsCl, что позволяет разделить тотальный препарат ДНК на фракции с разной плавучей плотностью. Зная, что плавучая плотность ДНК связана соответствующей формулой с мол.% Г+Ц, после соответствующих вычислений получают профиль, характеризующий долю молекул ДНК с различным мол.% Г+Ц в препарате тотальной ДНК бактериального сообщества. Полученные фракции ДНК могут быть в дальнейшем изучены более детально другими молекулярными методами – гибридизация, фингерпринтинг. (Добровольская и др. 2001), (Tiedje и др. 1990), (Stapleton и др. 1998). Особенно актуальны методы, основанные на использовании полимеразной цепной реакции. На сегодняшний день большинство работ по оценке биоразнообразия почв и изучению филогенетических взаимоотношений внутри сообществ микроорганизмов базируются на исследовании нуклеиновых кислот при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с соответствующими филогенетическими маркерами (16S рРНК, 18S рРНК и др.) (Грачев 2006). Ген 16S рРНК имеет как высококонсервативные, так и быстро эволюционирующие, переменные районы, исследование которых дает важную эволюционную информацию. Состав и последовательность нуклеотидов 16S рРНК широко используется в настоящее время для выявления филогенетического родства

между бактериями и активно применяется в таксономии и идентификации бактерий.

Исследование структуры гена 16S рРНК позволяет не только установить или уточнить таксономическое положение штаммов, но в иных ситуациях определить совершенно новые таксономические группы.

Широкое использование молекулярно-генетических методов, подробное изучение микроорганизмов – обитателей неисследованных ранее экологических ниш – приводят к описанию новых видов микроорганизмов (Жиленкова и др. 2014) . Таким образом, внедрение молекулярно-биологических методов в изучение микробных сообществ решает многие проблемы, связанные с ограниченными возможностями традиционных микробиологических и биохимических методов. Молекулярно-биологические методы предлагают новые возможности для анализа структуры и видового состава микробных сообществ, установления филогенетических связей, а также для выявления микроорганизмов, выполняющих определенную функциональную роль в исследуемых экосистемах. Среди данных методов наибольшее распространение получил метод амплификации генов-мишеней (ПЦР) (Бражникова и др. 2012).

1.9. Полимеразная цепная реакция в реальном времени как высокотехнологичный аналитический метод

Полимеразной цепной реакцией (ПЦР, PCR – polymerase chain reaction) называется метод получения множества копий определенных фрагментов ДНК (генов) в биологическом образце (Ребриков 2009).

Данный метод появился в середине 1980-х годов и очень быстро занял лидирующую позицию в фундаментальных исследованиях нуклеиновых кислот

и в ДНК-диагностике. Амплификация ДНК-мишени осуществляется в ходе повторяющихся циклов, каждый из которых включает:

- плавление (образование одноцепочечных молекул) ДНК-мишени при температуре выше 90°C;
- отжиг (гибридизация) на каждой одноцепочечной молекуле ДНК комплементарного олигонуклеотидного праймера при 55–65°C;
- достройку (синтез) фрагмента двухцепочечной молекулы ДНК термостабильной ДНК-полимеразой при 72°C (Глик, Пастернак 2002).

Для того чтобы происходило соблюдение высокой точности при воспроизведении указанных температурных режимов цикла амплификации необходимо использовать конструктивно сложные и дорогостоящие устройства – прецизионные программируемые термоциклеры (амплификаторы). По окончании цикла происходит удвоение фрагментов ДНК-мишени (при проведении n циклов количество фрагментов ДНК-мишени будет составлять $2n$). На практике для получения ампликонов (продуктов амплификации) в количестве, достаточном для их детектирования обычными аналитическими методами, необходимо около 30 циклов амплификации (Щелкунов 2004).

До недавнего времени наиболее распространенным методом детекции ампликонов являлся горизонтальный электрофорез в агарозном геле образца реакционной смеси после амплификации. Результат ПЦР считался положительным при выявлении фрагмента ДНК, соответствующего по своей молекулярной массе ампликону контрольного образца (Ведерников 2012).

Главным недостатком, который затрудняет использование классической ПЦР в диагностической практике, является необходимость манипуляций с продуктами амплификации (Ребриков 2009). В связи с этим при очень высокой чувствительности ПЦР всегда существует значительный риск получения результатов, являющихся ложными из-за перекрестной контаминации исследуемых образцов (Бикбулатова и др. 2012).

Таких недостатков не имеет ПЦР в реальном времени – Real-Time PCR (ПЦР-РВ). ПЦР РВ в настоящее время является одним из наиболее перспективных методов количественного анализа микробиологических сообществ (Рогатых и др. 2011). Этот метод является надежным инструментом для специфического количественного анализа нуклеиновых кислот, поэтому хорошо зарекомендовал себя в самых различных областях науки (Zammit и др. 2008).

В данном случае процессы амплификации и детекции ампликонов происходят одновременно в одной пробирке, что практически полностью исключает риск загрязнения ампликонами рабочих помещений, при этом сводится к абсолютному минимуму и риск получения ложноположительных результатов.

Наиболее широко для детекции ампликонов в ПЦР-РВ используются методы гибридизационно-флуоресцентной детекции (Saha и др. 2001). При этом амплифицированная ДНК гибридизуется с праймерами и с мечеными флуоресцентным красителем олигонуклеотидными зондами. Образовавшийся гибрид проходит автоматическую регистрацию флуоресцентным детектором.

Важным преимуществом ПЦР-РВ является количественная оценка числа копий ДНК целевого микроорганизма в исследуемом материале. Однако для реализации этого метода необходимы еще более сложные, чем для классической ПЦР устройства, специальные термоциклеры с прецизионной оптикой, позволяющие мониторировать интенсивность флуоресценции реакционной смеси. Современные термоциклеры для ПЦР-РВ оснащены каналами для детектирования флуоресценции в нескольких диапазонах длин волн, что позволило разработать мультиплексные форматы реакции (Батлуцкая и др., 2016)

1.10 Изучение микробного сообщества биогазовой станции "Лучки"

При помощи культивирования микроорганизмов на плотных питательных средах уже неоднократно проводились исследования состава микрофлоры сырья, которое используется для получения биогаза на станции «Лучки» и микробиологических сообществ первых стадий разложения биомассы при изменении различных параметров процесса (Меньшиков и др. 2016). Данный подход удобен для выявления качественного состава микрофлоры субстрата на технологических стадиях, где подавляющая часть микроорганизмов относится к аэробным, микроаэрофильным, или аэротолерантным группам.

Сотрудниками и студентами кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ» проводился анализ состава микробиологического сообщества сырья и первых стадий брожения, а также выявление его динамики по сезонам года. Для качественного анализа микрофлоры были проведены исследования колоний микроорганизмов, выросших в чашках Петри на различных селективных питательных средах.

Для выделения микроорганизмов, осуществляющих стадию гидролиза при получении биогаза использовали как стандартный метод десятичных разведений, так и биохимические тесты.

Качественный анализ родового состава бактериальной флоры определяли по морфологическим признакам колоний на питательных средах и клеток на микропрепаратах, использовали окраску по Граму.

Далее проводили ряд биохимических тестов ENTEROtest 24 для всех микроорганизмов, выделенных из субстрата в чистую культуру, с помощью которых определили бактерии до вида .

В ходе экспериментов были обнаружены группы бактерий следующих родов: *Bacillus* (рис.1.3.), *Escherichia* (представитель БГКП) (рис.1.4.),

Salmonella (рис.1.5.) плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* (Меньшиков и др. 2016).

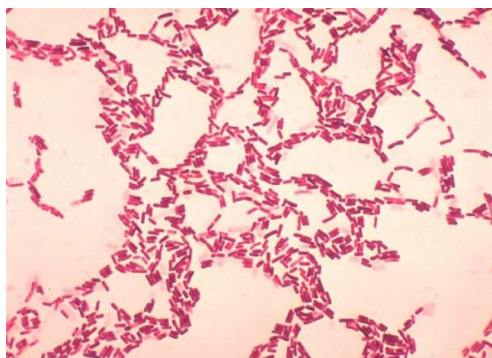


Рис.1.3. *Bacillus* фиксированный микропрепарат.

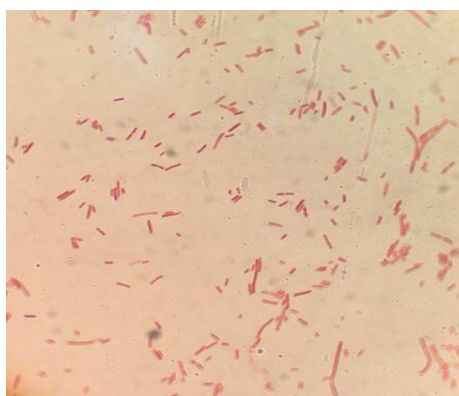


Рис.1.4. *Escherichia* фиксированный микропрепарат.

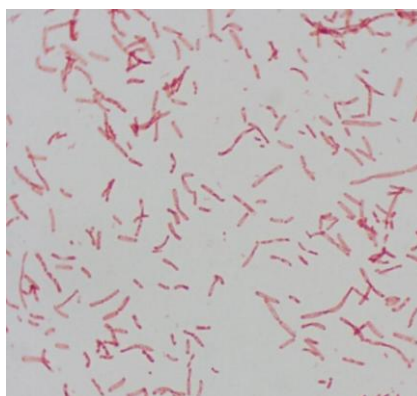


Рис.1.5. *Salmonella* фиксированный микропрепарат.

В ходе проведенного качественного анализа микрофлоры сырья, выяснено, что состав микроорганизмов постоянен, изменяется лишь количественная характеристика (Меньшиков и др. 2016).

В результате исследований в субстрате стадии гидролиза были обнаружены микроорганизмы таких видов, как *Proteus penneri*, *Edwardsiella ictaluri*, *Xenorhabdus nematophilus*, *Providencia rustigianii*, *Photorhabdus*

luminescens, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris* u *Yersinia aldorae* (Семькина, Линник 2017).

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. Методы выделения ДНК

Стандартная методика анализа таксономического состава смешанного бактериального сообщества включает следующие этапы:

- 1) получение препарата ДНК;
- 2) амплификация фрагментов последовательностей ДНК, кодирующих 16S рРНК при помощи ПЦР с универсальными и специфическими праймерами;
- 3) изучение амплифицированных последовательностей различными молекулярно-генетическими методами: методом прямого секвенирования, гибридизации с реперными последовательностями, разнообразными модификациями рестрикционного анализа с использованием различных приемов гель-электрофореза;
- 4) анализ полученной информации о последовательностях путем сравнения с доступными базами данных о последовательностях.

2.1.1. Выделение ДНК методом фенольной экстракции

Методика выделения суммарной геномной ДНК микробного сообщества реактора биогазовой станции из проб сбрасываемой субстратной смеси путём фенольной экстракции (Maniatis и др. 1982) включала следующие этапы:

1. Дополнительное измельчение частиц сбрасываемой смеси при помощи ручного блендера;
2. Экстракция ДНК фенолом;
3. Экстракция ДНК хлороформом;
4. Переосаждение ДНК этанолом.

Дополнительное измельчение частиц сбраживаемой смеси при помощи ручного блендера представляется необходимым по причине неравномерности распределения микроорганизмов в субстратной смеси. Субстратная смесь представляет собой суспензию с гранулами различного размера. Размеры наиболее крупных частиц могут достигать до нескольких миллиметров. Развитие микроорганизмов при этом может происходить как на поверхности гранул, так и в их глубине. Таким образом, дополнительное измельчение частиц субстратной смеси необходимо для более полной экстракции ДНК микробного сообщества.

Экстракция полученного гомогенизата фенолом проводилась с использованием препарата фенола, насыщенного 10 мМ буферным раствором трис-НСl рН 8,0, при соотношении объёмов фенола и экстрагируемой смеси 1:1. После добавления фенола смесь встряхивали, доводя до состояния эмульсии, за тем центрифугировали при комнатной температуре 10 мин, 10000 об/мин. Водную фазу отбирали и добавляли к ней хлороформ в объёмном соотношении 1:1, также встряхивали до состояния эмульсии. К отобранной водной фазе добавляли 96% этанол в объёмном соотношении 2,5 объёмных единицы этанола к 1 объёмной единице смеси, встряхивали и центрифугировали при комнатной температуре 10 мин, 10 000 об/мин. Полученный осадок промывали 100 мкл 70% этанола и высушивали на воздухе.

2.1.2. Выделение ДНК методом щелочного лизиса

Выделение ДНК методом щелочного лизиса (Birnbom и др. 1979), (Klitschar, Neuhuber 2000) проводилось с использованием набора реактивов «ДНК-Экстран-3» (ДНК-Экстран-3...2017) отечественной фирмы «Синтол». К 30 мкл субстрата добавляли 20 мкл лизирующего раствора, и, после

гомогенизации растиранием при помощи стеклянной палочки в присутствии стерилизованного песка, добавляли еще 280 мкл раствора. Далее вносили 3 мкл раствора РНКазы и, после перемешивания, инкубировали в течение часа при 60 °С. Затем к полученному лизату добавляли 100 мкл осаждающего раствора «1» и после перемешивания центрифугировали при комнатной температуре 10 мин, 10 000 об/мин. Супернатант переносили в чистые пробирки и осаждали при помощи 300 мкл осаждающего раствора «2» и перемешивали. Затем повторяли центрифугирование, удаляли жидкость и высушивали осадок. Точный состав растворов является коммерческим секретом фирмы-производителя.

2.1.3 Выделение ДНК с использованием магнитных частиц

Выделение ДНК с использованием магнитных частиц (Berensmeier и др. 2006) проводили при помощи реактивов, входящих в набор «М-Сорб-ООМ» (Набор реагентов «М-Сорб-ООМ»...2017) фирмы «Синтол». К 100 мкл пробы промышленного субстрата для получения биогаза добавляли смесь 500 мкл лизирующего раствора и 10 мкл лизирующего компонента, перемешивали и инкубировали 15 мин при 65 °С. Затем центрифугировали смесь при 4000 об/мин в течение 30 сек. К супернатанту добавляли 60 мкл сорбирующего раствора, содержащего магнитные частицы, и 400 мкл осаждающего раствора, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем центрифугировали пробирки при 4000 об/мин в течение 3 мин. После удаления надосадочной жидкости вносили в пробирки по 500 мкл промывочного раствора «А», перемешивали и вновь центрифугировали. После центрифугирования устанавливали пробирки на 1 мин на магнитный штатив для отделения магнитных частиц от жидкости, в которой они суспендированы. Жидкость удаляли, к осадку добавляли 500 мкл промывочного раствора «Б».

Затем вновь перемешивали, центрифугировали (как и ранее, 4000 об/мин, 3 мин), и на 1 мин помещали на магнитный штатив. Таким же образом проводили промывку промывочным раствором «С». После удаления раствора «С» инкубировали пробирки с открытыми крышками при 65 °С для выпаривания остатков жидкости в течение 5 мин. Для элюции ДНК с магнитных частиц, добавляли к ним 100 мкл элюирующего раствора, перемешивали и термостатировали в течение 10 мин при 65 °С. Затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 3 мин и устанавливали на 1 мин на магнитный штатив. Водную фазу, содержащую ДНК, отбирали и замораживали для хранения. Точный состав использованных растворов является коммерческим секретом фирмы-производителя.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Сравнение результатов применения различных методов выделения ДНК для получения препаратов суммарной геномной ДНК микробного сообщества промышленного биогазового реактора

Путём применения трёх различных подходов, нами были получены три препарата суммарной геномной ДНК микробного сообщества промышленного биогазового реактора, использованные для сравнительного анализа методом электрофореза в агарозном геле. Полученная электрофореграмма (рис. 3.1.) продемонстрировала незначительное содержание ДНК в препарате, полученном путём щелочного лизиса, максимальное её количество в препарате, полученном с использованием магнитных частиц и наличие ДНК в препарате, полученном путём фенольной экстракции.

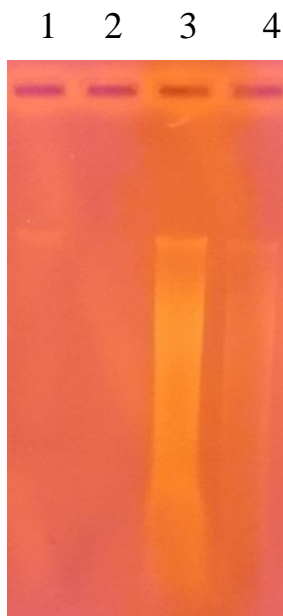


Рис. 3.1. Электрофореграмма препаратов суммарной геномной ДНК, выделенной из промышленного субстрата биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» (2 – 4) в сравнении с препаратом геномной ДНК сенной палочки (*Bacillus subtilis*) (1). 2 – препарат, полученный методом щелочного лизиса, 3 – препарат, полученный с использованием магнитных частиц, 4 – препарат, полученный путём фенольной экстракции

На основании полученных результатов для дальнейшего анализа был выбран препарат, полученный с использованием магнитных частиц. Метод, включающий их применение, разработанный на основе фирменной методики фирмы «Синтол», был выбран для дальнейшего применения.

3.2. Проверка отсутствия ингибиторов ДНК-полимеразы в полученных образцах ДНК

Ингибиторами полимеразной цепной реакции могут служить вещества, оставшиеся или внесённые при очистке ДНК из клеточных лизатов – белки, спирты, фенол итп. Чтобы проверить пригодность полученного нами препарата для ПЦР РВ, мы поставили с ним пробную реакцию.

Для проведения пробной реакции были выбраны реактивы отечественной компании «Синтол». Использовались четыре пары праймеров, подобранных на основании литературных данных (2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ...2017), (Guo и др.2008), (De Gregoris и др.2011), (Yun-Wen Yang et al 2015). Первые две пары праймеров обладали специфичностью к последовательностям гена 16S рибосомальной РНК эубактерий (*Bacteria*), третья – к тому же гену одного из типов эубактерий, фирмикут (*Firmicutes*). Они дают ПЦР-продукты сходной длины (200-300 п.н.) и способны функционировать при одинаковой температуре отжига (61°C), что позволяет использовать их для оценки представленности ДНК фирмикут в образце суммарной бактериальной ДНК. В проведённом нами эксперименте значения C_q для пары праймеров, специфичной к фирмикутам, закономерно больше, чем C_q для пар, специфичных ко всем эубактериям. Для первой и второй пар такие значения закономерно близки. Четвёртая пара праймеров, специфичная к тому же гену большинства представителей эубактерий, но дающая ПЦР-продукт значительно

большой длины (около 1500 п.н.), закономерно демонстрирует более низкую скорость амплификации и выход кривой на плато при более низком значении интенсивности флуоресценции (рис. 3.2).

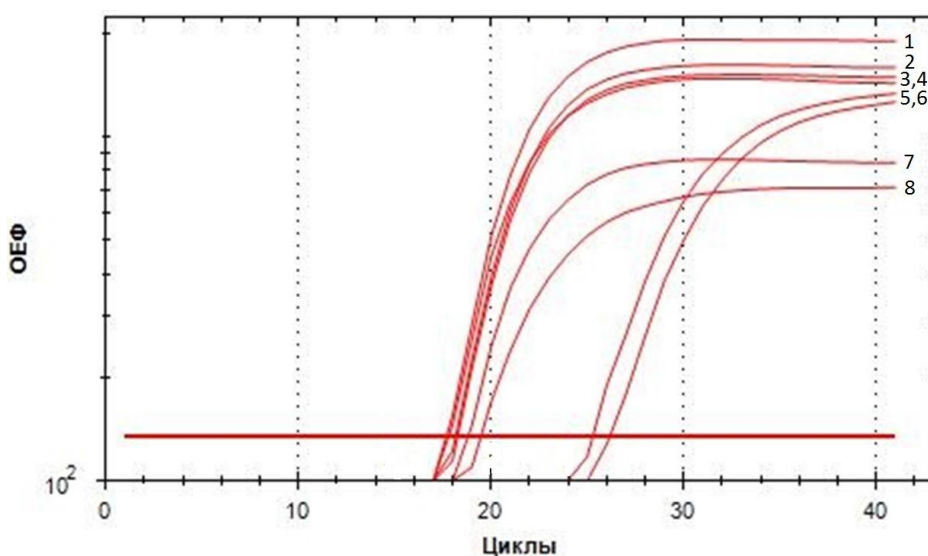


Рис. 3.2. Кривые флуоресценции в реакционных смесях, полученные при анализе препарата ДНК: 1,2 – царство эубактерии (*Eubacteria*, 926F/1062R); 3,4 – царство эубактерии (*Eubacteria*, Eub338F/Eub518R); 5,6 – царство эубактерии (*Eubacteria*, 27F/1525R), длинный ПЦР-продукт (1500 п.н.); 7,8 – тип фирмикуты (*Firmicutes*, Firm934F/Firm1060R). Каждая реакция проведена в двух параллельных повторностях

Полученные результаты продемонстрировали близкие скорости амплификации с использованием праймеров, специфичных к таксонам различного ранга, на одной ДНК-матрице, что подтверждает литературные данные о целесообразности их совместного использования. Четвёртая пара праймеров, дающая ПЦР-продукт значительно большей длины (около 1500 п.н.), закономерно демонстрирует более низкую скорость амплификации и выход кривой на плато при более низком значении интенсивности флуоресценции.

Значения S_q , безразмерной величины, выступающей количественным результатом анализа ДНК-содержащих проб путём полимеразной цепной реакции в реальном времени, являются сходными для трёх пар праймеров, предназначенных для анализа присутствия таксонов различного ранга, к которым относится эубактерия *Bacillus subtilis*, выбранная в качестве контрольного объекта исследования (табл. 3.1.). Также сходными являются

значения C_q , полученные для парных повторностей, что положительно характеризует воспроизводимость полученных результатов. Использование пары праймеров, предназначенной для получения более длинного, чем другие, ПЦР-продукта, ведёт к повышенным значениям C_q , что полностью согласуется с теорией применяемого метода и служит дополнительным контролем, подтверждающим предсказуемое поведение экспериментальной системы.

Таблица 3.1.

Пары праймеров, использованные в работе и значения C_q , полученные в реакциях ПЦР РВ с их использованием

Специфичность пары праймеров	Названия праймеров	Последовательности праймеров	Длина ПЦР-продукта, п.н.	Значение C_q (безразмерная величина)
Царство Эубактерии	926F 1062R	AAACTCAAAGGAATTGACGG CTCACRRCACGAGCTGAC	36	18,15
Царство Эубактерии	Eub338F Eub518R	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	200	18,25
Тип Фирмикуты	Firm934F Firm1060R	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	126	18,62
Царство Эубактерии	27F 1525R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AAGGAGGTGWTCCARCC	1500	25,67

Таким образом, пробный эксперимент подтвердил пригодность полученного препарата ДНК-матрицы для анализа путём количественной ПЦР.

Было выявлено, что при смешивании полученного с использованием набора «М-Сорб-ООМ» препарата ДНК с раствором фенола рН8,0 на границе раздела фаз образуется белый налёт, свидетельствующий о наличии определённых примесей. По этой причине фирменную методику было решено дополнить фенольной экстракцией, экстракцией хлороформом и спиртовым осаждением.

В ходе эксперимента получены ожидаемые результаты, служащие подтверждением как используемых литературных данных, так и адекватности выбранных условий эксперимента.

3.3. Обсуждение полученных результатов

При выборе методов выделения ДНК мы принимали во внимание доступность используемых реактивов, ориентируясь на возможность рутинного выполнения анализов в интересах коммерческих производств. Поэтому предпочтение было отдано с одной стороны классическому методу фенольной экстракции, а с другой – наборам отечественной фирмы Синтол, стоимость продукции которой на порядок ниже, по отношению к стоимости зарубежных фирм. При этом продукция зарубежных фирм, согласно предоставляемой ими информации, нередко обладает определенными преимуществами.

Так, например, компания Norgen biotek corn (Канада) предлагает набор реактивов, который позволяет проводить выделение ДНК из всех типов почв, включая сложные образцы с высоким содержанием гуминовых кислот, такие как компост, торф и навоз; выделять суммарную ДНК из всех микроорганизмов, обнаруженных в почве, включая бактерии, грибы и водоросли. Данный набор удаляет все следы гуминовых кислот, используя микроколони для удаления гуминовых кислот, также постулируется высокая степень очистки от других органических кислот и другой низкомолекулярной органики. Получаемые препараты ДНК, таким образом, имеют самое высокое качество и полностью совместимы с последующим применением в ПЦР и ПЦР РВ, а так же любыми метагеномными исследованиями, так как все органические примеси, в том числе и ингибиторы ПЦР, удаляются во время

выделения (Набор реагентов для выделения ДНК/РНК клинических образцов и объектов окружающей среды. Norgen biotek com 2018).

Компания Sigma-aldrich (США) предоставляет набор реактивов для выделения ДНК, который обеспечивает удобный и быстрый метод обнаружения микроорганизмов из образцов почвы. Образцы всех типов почвы могут быть обработаны при помощи этого набора, включая общие образцы почвы и сложные образцы грунта с высоким содержанием гуминовых кислот, такие как компост и навоз. Набор удаляет все следы гуминовых кислот, используя микроколоники для удаления гуминовых и других органических кислот. Далее производитель предлагает использовать спиновой столбец для очистки ДНК. Геномная ДНК может быть выделена и очищена из всех обнаруженных микроорганизмов в почве (бактерии, грибы и водоросли). Очищенная ДНК имеет высокое качество и полностью совместима с ПЦ и ПЦР РВ, поскольку все гуминовые кислоты, вещества и ингибиторы ПЦР удаляются во время выделения. Очистка основана на спиновой колоночной хроматографии. Процесс выделения состоит из следующих этапов:

1. добавление в образец почвы лизис буфера G и добавка лизиса А к предоставленной трубе из бисера и последующая гомогенизация образца;
2. центрифугирование и перенесение супернатанта в бесцентровую микроцентрифужную пробирку;
3. инкубация буфера связывания I и лизата в течение 5 минут во льду;
4. вращение чистого лизата в колонке удаления гуминовых кислот, собирание потока и добавление этанола;
5. загрузка в спин-колонку, которая связывает только ДНК;
6. промывка связанной ДНК, используя буфер SK и промывочный раствор А;
7. элюирация ДНК с использованием буфера элюирования В.

В итоге получается ДНК, очищенная от всех ингибиторов, включая гуминовые кислоты, которые могут быть использованы в чувствительных

нисходящих приложениях, включая ПЦР (Набор реагентов для выделения ДНК/РНК клинических образцов и объектов окружающей среды 2018).

Компания Qagen (Германия), являющаяся мировым лидером по разработке реагентов и оборудования для проведения фундаментальных и прикладных исследований в области молекулярной биологии, предоставляет наборы реактивов, которые позволяют устранять гуминовые вещества и другие ингибиторы ПЦР для ДНК.

Комплект DNeasy PowerSoil использует запатентованную технологию удаления ингибиторов для очистки микробной геномной ДНК из всех типов почв и образцов окружающей среды, а также образцов навоза, стула и других твёрдых биологических образцов. Выделенная ДНК имеет наивысший уровень чистоты, что позволяет успешно проводить ПЦР и ПЦР РВ, секвенирование Сэнгера или NGS организмов из образца. Набор идеально подходит для обработки всех образцов окружающей среды, включая материалы с высоким содержанием гуминовых кислот, такие как компост, осадок и навоз. Используя наборы реактивов этой фирмы, можно проводить ПЦР-анализ для обнаружения множества организмов, включая как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*), грибы (например, дрожжи, плесени), водоросли и актиномицеты (например, *Streptomyces*) и нематоды (Набор реагентов DNeasy PowerSoil для выделения ДНК/РНК клинических образцов и объектов окружающей среды Qagen 2018).

Таким образом видно, что использование реагентов для выделения геномной ДНК микробного сообщества зарубежных фирм происходит более эффективно и быстро, так как в набор входят микроколоники, что значительно поднимает стоимость, но так же можно использовать реактивы отечественной фирмы Синтол, которые значительно дешевле, но при этом так же происходит качественная очистка геномной ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционные микробиологические методы исследования сброживаемой массы биогаза являются значимыми при определении видового состава действующего микробиологического сообщества. Используя данные методы необходимо проводить культивирование микроорганизмов (приготовление питательных сред, разведение бактериальных культур, посев, подсчет бактериальных клеток); микрокопирование; идентификацию чистых культур (до вида микроорганизма), учитывая морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические, антигенные свойства микроорганизмов.

Однако применение такого комплекса методов является достаточно трудоемким, затратным, требующим участия большого числа обученных специалистов. В настоящее время стремительно развивается комплекс молекулярных методов определения видового состава микробиологического сообщества на основе выделения суммарной ДНК с последующей идентификацией микроорганизмов.

Применение молекулярно-биологических методов в микробиологии дает возможность более глубокого изучения микробных сообществ. Данные методы позволяют идентифицировать и определять разнообразие микроорганизмов в различных средах. Становится возможным изучать изменения состава микробных сообществ под воздействием различных факторов, идентифицировать отдельные природные микробные популяции или функциональные свойства сообществ.

В ходе выполненной работы были отработаны три известные методики, определена и адаптирована методика, основанная на применении магнитных частиц, разработанных отечественным производителем расходных материалов для молекулярно-биологических исследований, так как показывает максимальное количество ДНК в препарате. Разработаны методические

рекомендации для учебного процесса, а именно использование методики выделения ДНК методом фенольной экстракции в связи с ее экономической выгодностью (Приложение 1). Выбран оптимальный подход к выделению суммарной геномной ДНК микробного сообщества из смеси органических отходов, используемой в качестве субстрата для промышленного получения биогаза. Выявлена корректность инновационного подхода, предполагающего использование магнитных частиц для сорбции нуклеиновых кислот в приложении к поставленной нетривиальной задаче их выделения из сложной двухфазной смеси органических веществ, служащей субстратом для развития микробного сообщества. Подтверждена чистота полученного препарата ДНК, достаточная для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени, что свидетельствует об отсутствии в полученном препарате существенных концентраций веществ, выступающих ингибиторами ДНК-полимеразы.

Таким образом, решены экспериментальные задачи, поставленные в ходе планирования эксперимента:

1. Выделена суммарная микробная ДНК тремя различными методами
2. Проведен сравнительный анализ полученных препаратов для определения наиболее эффективного метода выделения ДНК из сбраживаемой массы. Метод выделения ДНК, основанный на использовании сорбирующих магнитных микрочастиц производства компании «Синтол» (Россия) для получения препаратов суммарной геномной ДНК микробных сообществ промышленных биогазовых реакторов, оказался эффективнее по отношению к методу щелочного лизиса и методу выделения ДНК путем фенольной экстракции.
3. Подтверждена применимость полученного препарата методом выделения ДНК с использованием магнитных частиц для анализа методом ПЦР РВ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонова, О. С., Корнева, Н. А., Белов Ю. В., Курочкин, В. Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии. // Научное приборостроение. – 2010. – Том 20. – №1. – С 3–9.
2. Баадер, В. Биогаз: теория и практика / В. Баадер, Е. Доне. – М.: Колос, 2002. – 184 с.
3. Батлущая, И. В., Бредихин, В. П., Мейлах, И. К., Украинский, П. В., Кистаубаева, А. С., Ключева, В. В., Дегтярёва, К. А., Кортюкова, Е. А., Шкуропат, М. Н. Влияние целлюлозоразрушающих ферментов на активность метанообразующих бактерий в условиях лабораторной биогазовой установки АО «Белгородский институт альтернативной энергетики» на субстрате действующей биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» // Научные ведомости БелГУ, Серия Естественные науки. – 2016. – №25 (246), Выпуск 37. – С. 56–62.
4. Белгородский институт альтернативной энергетики. – 2013. – Режим доступа: <http://www.altenergo-nii.ru/projects/biogaz/>
5. Бражникова, Е. В., Мукашева, Т.Д., Шигаева, М. Х., Цзю, В. Л, Игнатова, Л. В., Бержанова, Р. Ж., Сыдыкбекова, Р. К., Каргаева, М.Т. Молекулярно-биологические методы в оценке микробного разнообразия почв // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2012. – №1 (53). – 125 с.
6. Бикбулатова, С. М., Чемерис, Д.А., Никоноров, 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, № 3. – С.59–67.

7. Боровский, Ю.В. Энергетическая безопасность как понятие и проблема. Учебное пособие / Ю.В. Боровский. – М.: МГИМО-Университет, 2016. – 128 с.
8. Быстрицкий, Г.Ф. Основы энергетики: учебник / Г.Ф. Быстрицкий. – М.: Кнорус, 2012. – 352с.
9. Вандышева, М. С. Биогаз – альтернативный источник энергии // Вестник НГИЭИ – 2014. – №6 (37). – С. 22–26.
10. Варфоломеев, С. Д. Биотоплива – энергоносители из возобновляемого сырья // Катализ в промышленности. – 2010. – №5. – С. 8–10.
11. Васильева, И. С., Баканова, С. В. Альтернативный энергоноситель – биогаз // Уральский научный вестник – 2018. – Т1, №2. – С. 59–61.
12. 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.
13. Ведерников, В. Е. Сравнительная характеристика способов экстракции нуклеиновых кислот // Лаборатория – 2012. – №4. – С.14–15.
14. Верещагин, О. А. Стратегические альтернативы традиционным энергоносителям // Мировая экономика и международные отношения. – 2009. – №2. – С. 32–38.
15. Вертакова. Ю. В. Альтернативная энергетика. Развитие зеленой экономики в энергетике // Энергетическая безопасность: сборник научных статей. – 2017 – С. 24–26.
16. Владимирова, А. Ф. Состояние и тенденции развития энергетики в мире // Вестник Университета. – 2013. – № 23. – С.10–13.
17. 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.

18. Глик, Б., Пастернак, Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак — М.: Мир, 2002. — 589 с.
19. Голицын, М.В., Голицын, А.М., Пронина, М.Н. Альтернативные энергоносители / М.В. Голицын, А.М. Голицын, М.Н. Пронина – М.: Наук, 2004. – 159 с.
20. 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.
21. ДНК-Экстран-3 Набор реагентов для выделения геномной ДНК из растений. Синтол, EX-513-100. – 2017. – Режим доступа: www.syntol.ru.
22. Добровольская, Т.Г., Лысак, Л. В., Зенова, Г. М., Звягинцев, Д. Г. Бактериальное разнообразие почв: оценка методов, возможностей, перспектив // Микробиология. – 2001. – Т.70, №2. – С.149–167.
23. 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.
24. 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.
25. Зебзеев, Г. З. Биогаз как возобновляемый энергоресурс агропромышленных технологий // Наука. Технологии. Инновации. – Новосибирск: Новосибирский государственный технический университет, 2017. – С. 203–206.
26. Клавдиенко, В. П. Мировая торговля энергоносителями // Энергия: экономика, техника, экология. – 2003. – №3. – С.2–8.
27. Кобезский, В. А., Соколов, М. М. Биогаз: перспективы и особенности использования как возобновляемого источника энергии // VI Всероссийский фестиваль науки Сборник докладов в 2-х томах. – Нижний

Новгород: Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет, 2016. – С. 219–222.

28. Колокольцев, С.Н. Природные энергоносители и углеродные материалы. Состав и строение. Современная классификация. Технологии производства и добыча / С.Н. Колокольцев. – М.: Ленандат, 2015. – 415 с.

29. Макевнин, С. Г., Вакулин, А. А.. Охрана природы / С. Г. Макевнин, А. А. Вакулин. – М.: Агропромиздат, 2007. — 434 с

30. Мановян, А.К. Технология переработки природных энергоносителей / А.К. Мановян. – М.: Колос, 2004. – 456с.

31. Мариненко, Е. Е. Основы получения и использования биотоплива для решения вопросов энергосбережения и охраны окружающей среды в жилищно-коммунальном и сельском хозяйстве / Е. Е. Мариенко. – Волгоград: ВолгГАСА, 2003. – 100 с.

32. Меньшиков, Н. О., Сиротин, А. А., Ткаченко, Н. Н. Исследование микрофлоры сырья при производстве биогаза // Современные научные исследования и инновации – 2016. – №8. – Режим доступа: <http://web.snauka.ru/issues/2016/08/70463>.

33. Набор реагентов «М-Сорб-ООМ» для выделения ДНК/РНК из клинических образцов и объектов окружающей среды. Синтол, ООМ-502. – 2017. – Режим доступа: www.syntol.ru.

34. Набор реагентов для выделения ДНК/РНК клинических образцов и объектов окружающей среды. Norgen biotek corn. – 2018. – Режим доступа: <https://norgenbiotek.com/product/soil-dna-isolation-kit>.

35. Набор реагентов DNeasy PowerSoil для выделения ДНК/РНК клинических образцов и объектов окружающей среды Qagen. – 2018. – Режим доступа: <https://mobio.com/products/dna-isolation/soil/powersoil-dna-isolation-kit.html>.

36. Набор реагентов для выделения ДНК/РНК клинических образцов и объектов окружающей среды. – 2018. – Режим доступа:

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/2/dnb100bul.pdf>.

37. Нетрусов, А. И., Котова, И. Б. Микробиология 3-е изд., испр./ А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М.: Академия, 2009. – 352 с.

38. Опыт Белгородской области: биогаз и биоудобрения. – 2015. – Режим доступа: http://rmrl.ru/blog/post_65.

39. Панцхава, Е. С. Биоэнергетика мир и Россия. Биогаз: теория и практика. / Е. С. Панцхава. – М.: «Русайнс», 2014. – 972с.

40. Пискаева, А. И. Анализ способов переработки сельскохозяйственных органических отходов на примере куриного помета // Аэкономика: экономика и сельское хозяйство. – 2016. – №4 (12). – 5–8с.

41. Правительство Белгородской области. Постановление. Об утверждении долгосрочной целевой программы "Энергосбережение и повышение энергетической эффективности белгородской области на 2010-2015 годы и целевые показатели на период до 2020 года": постановление правительства Белгородской области от 30.11. 2010 №364 – пп. – Белгород, 2010. – 38с.

42. 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.

43. 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.

44. Рябышенков, А. С., Ларионов, Н. М. Промышленная экология / А. С. Рябышенов, Н. М. Ларионов. – М.: Юрайт, 2017. – 496 с.

45. Развитие отраслей животноводства Белгородской области. – 2018. – Режим доступа: <https://belapk.ru/press-centr/novosti/proshlo-soveshanie-po-razvitiyu-otraslej-zhivotnov>.
46. Садчиков, А. В. Биогаз и методы его отчистки // Успехи современной науки и образования – 2017. – Т. 5. № 2. – С. 47–49.
47. Сазыкин, Ю. О., Орехов, С. Н., Чакалева, И. И. Биотехнология: учебное пособие для студентов высш. учебн. заведений / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева; под ред. А. В. Катлинского. — М.: Академия, 2008. — 256 с.
48. Семькина, В. В., Линник, А. В. Определение качественного состава микрофлоры стадии гидролиза производства биогаза // Естественнонаучные, инженерные и экономические исследования в технике, промышленности, медицине и сельском хозяйстве: материалы I Молодёжной научно-практической конференции с международным участием; под общ. ред. С.Н. Девицыной. – Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2017. – 693 с.
49. 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>
50. Стребков, Д. С., Ковалев, А. А. Биогазовые установки для обработки отходов животноводства. // Техника и оборудование для села. – 2006. – №11. – С. 28–30.
51. Торшин, В. В., Пащенко, Ф. Ф., Круковский, Л. Е. Альтернативная энергетика: прошлое, настоящее, будущее / В. В. Торшин, Ф. Ф. Пащенко, Л. Е. Круковский. – М.: Белый берег, 2009. – 261с.
52. Чумаков, А. Н. Альтернативная энергетика России: потенциал и перспективы освоения. // Вестник экологического образования в России – 2010. – №2. – С.18–20.
53. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. — 496 с.

54. Шеина, О. А., Сысоев, В. А. Биохимия процесса биогаза как альтернативного источника энергии // Вестник ТГУ. – 2009. –Т.14., №.3. – С.73–77.
55. Шигапов, И. И. Торговля энергоносителями // Современное развитие экономических и правовых отношений. Образование и образовательная деятельность. – 2014. – №1. – С. 415–421.
56. Эффективные технологии утилизации органических отходов // Рынок АПК – 2015. – Режим доступа: <https://rynok-apk.ru/magazine>.
57. 2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I. Синтол, Кат. № М-427. – 2017. – ЭРежим доступа: www.syntol.ru.
58. Berensmeier, S. Magnetic Particles for the Separation and Purification of Nucleic Acids // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – №. 73. – P. 495–504.
59. Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids // J.Clin. Microbiol. – 1990. – №. 28. – P.495–503
60. Birnboim, H. C., Doly, J. A Rapid procedure for screening recombinant alkaline plasmid DNA // Nucl. Acid Res. – 1979 – №7. – P. 1513–1523.
61. 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.
62. 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
63. 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.
64. Kříčová, Jana, Španová, Alena, Rittich, Bohuslav, Horák, Daniel Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation/ //J. Chromatogr. – 2005. – № 2. – P. 247-253.

65. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. Molecular cloning. A laboratory manual / T. Maniatis, E. F. Fritsch, J Sambrook. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. –545 pp.
66. Moss, D., Harbison, S.A., Saul, D. J. An Easily Automated, Closed-Tube Forensic DNA Extraction Procedure Using a Thermostable Proteinase // *Int. J. Legal Med.* – 2003. – №. 117. – P. 340–349.
67. 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.
68. Papusheva, E. P., Sherbakov, D. Yu., Sitnikova, T. Ya., Zubakov, D. Yu., Blinov, A. G., Starobogatov, Ya. I. Molecular phylogeny of the genus *Choanomphalus* (Pulmonata: Planorbidae) // *Ruthenica.* – 2003– №13.– P. 75–80
69. 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.
70. Saha, B. K., Tian, B., Bucy, R. P. Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe // *Virological Methods* – 2001 – №93. – P. 33–42
71. Stadler, J., Lemmens, R., Nyhammar, T. Plasmid DNA Purification // *J. Gene Med.* – 2004. – №. 6. – P. 54–66
72. Stapleton, R. D., Ripp, S., Jimenez, L., Cheol-Koh, S., Fleming, J. T., Gregory, I. R., Sayler, G. S. Nucleic acid analytical approaches in bioremediation: site assessment and characterization // *J. Microbiol. Methods.* – 1998. – №. 32. – P. 165–178.
73. 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

74. 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.

75. 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.

76. Zammit, C. M., Mutch, L. A., Watkin, E. L., Watling, H. R. Evaluation of quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of biomining microorganisms in culture // Hydrometallurgy. – 2008 – Vol. 94, № 1-4 – P 185–189.

77. Yun-Wen Yang et al. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces / Applied and Environmental Microbiology – 2015 – Vol. 81, №. 19 – P. 6749–6756.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Методические рекомендации для проведения лабораторных занятий
для бакалавров и магистрантов кафедры биотехнологии и микробиологии
по выделению суммарной ДНК из смеси органических отходов, применяемой
для промышленного получения метана

Тема: выделение суммарной ДНК из смеси органических отходов,
применяемой для промышленного получения метана

План

1. Изучение методики выделения суммарной ДНК из смеси органических отходов, применяемой для промышленного получения метана;
2. .Отработка методики выделения суммарной ДНК из смеси органических отходов, применяемой для промышленного получения метана.

1.1. Материалы и оборудование

2. Хлороформ
3. Фенол
4. Этанол;
5. микроробирки;
6. Центрифуга.
7. весы;
8. рН-метр;
9. пипетки автоматические

1.2. 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.

1.3. Приготовление рабочих растворов

При приготовлении буферов и растворов соблюдайте следующие правила:

1. Готовьте все растворы на бидистиллированной деионизованной воде.

2. По возможности стерилизуйте все растворы автоклавированием или фильтрованием через 0,22-мкм фильтр.

Таблица 1

Однокомпонентные растворы

Растворы	Метод	Примечания
1М Трис-НСl, рН8,0	Растворить 121,1 г триса в 80 мл Н ₂ О, добавить 42 мл концентрированной (конц.) НСl. Остудить раствор до комнатной температуры перед окончательным доведением рН. Довести рН до 8,0 титрованием конц. НСl. Довести объем раствора до 1 литра.	1. Раствор стерилизовать автоклавированием. 2. Приблизительное количество конц. НСl для приготовления растворов 1М Трис-НСl другого рН: рН 7,4 – 70 мл рН 7,6 – 60 мл рН 8,0 – 42 мл 3. Титровать, перемешивая раствор магнитной мешалкой.
0,5М ЭДТА, рН 8,0	Добавить 186,1 г двухзамещенной соли ЭДТА. 2Н ₂ О к 800 мл Н ₂ О. Интенсивно размешать на магнитной мешалке. Довести рН до 8,0, добавляя NaOH (приблизительное количество - 20 г.).	1. Раствор стерилизовать автоклавированием. 2. Динатриевая соль ЭДТА не растворится до тех пор, пока рН раствора не будет доведен добавлением NaOH приблизительно до 8,0.
10% додецилсульфат натрия (SDS) или лаурилсульфат натрия	Растворить 100 г SDS в 900 мл Н ₂ О. Нагреть до 68°C для ускорения растворения. Довести рН до 7,2 добавлением нескольких капель конц. НСl. Довести объем до 1 л	1. С SDS работать в вытяжном шкафу. 2. SDS стерилизовать нет необходимости.
7,5 М ацетат аммония	Растворить 577,5 г ацетата аммония. 4Н ₂ О в 800 мл Н ₂ О. Довести объем до 1л	Стерилизовать фильтрованием
Бромистый этидий, 1 мг/мл	Растворить 0,1 г бромистого этидия в 100 мл Н ₂ О. Размешать до полного растворения на магнитной	Сильный мутаген. Взвешивать в перчатках и маске под тягой. Хранить в темной склянке

	мешалке.	при 4°C
--	----------	---------

1.3. Ход работы

Методика выделения суммарной геномной ДНК микробного сообщества реактора биогазовой станции из проб сбраживаемой субстратной смеси путём фенольной экстракции состоит из следующих этапов:

1. Дополнительное измельчение частиц сбраживаемой смеси при помощи ручного блендера;
2. Экстракция ДНК фенолом;
3. Экстракция ДНК хлороформом;
4. Переосаждение ДНК этанолом.

Дополнительное измельчение частиц сбраживаемой смеси при помощи ручного блендера представляется необходимым по причине неравномерности распределения микроорганизмов в субстратной смеси. Субстратная смесь представляет собой суспензию с гранулами различного размера. Размеры наиболее крупных частиц могут достигать до нескольких миллиметров. Развитие микроорганизмов при этом может происходить как на поверхности гранул, так и в их глубине. Таким образом, дополнительное измельчение частиц субстратной смеси необходимо для более полной экстракции ДНК микробного сообщества.

1. Экстракция полученного гомогенизата фенолом проводится с использованием препарата фенола, насыщенного 10 мМ буферным раствором трис-HCl pH 8,0, при соотношении объёмов фенола и экстрагируемой смеси 1:1.

2. После добавления фенола смесь необходимо встряхнуть, довести до состояния эмульсии, затем провести центрифугирование при комнатной температуре 10 мин, 10000 об/мин.

3. Отобрать водную фазу и к ней добавить хлороформ в объёмном соотношении 1:1, встряхнуть до состояния эмульсии.
4. К отобранной водной фазе добавить 96% этанол в объёмном соотношении 2,5 объёмных единицы этанола к 1 объёмной единице смеси, встряхнуть и центрифугировать при комнатной температуре 10 мин, 10 000 об/мин.
5. Полученный осадок промыть 100 мкл 70% этанола и высушить на воздухе.

Контрольные вопросы

1. Особенности выделения ДНК эукариот.
2. Перечислите основные этапы выделения ДНК методом фенольной экстракции.