

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ДИНАМИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
ПРИ КОМПСТИРОВАНИИ АНАЭРОБНО ОБРАБОТАННОГО
ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД

© 2020 г. В. В. Миронов^{а, *}, Е. А. Бочкова^а, А. В. Ганнесен^а,
А. В. Вантеева^а, Ю. И. Русскова^а, А. Н. Ножевникова^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: 7390530@gmail.com

Поступила в редакцию 18.03.2020 г.

После доработки 26.03.2020 г.

Принята к публикации 30.03.2020 г.

Проведено исследование микробиологических процессов при контролируемом термофильном компостировании обезвоженных анаэробно обработанных в метантенке осадков сточных вод (АнОСВ) Люберецких очистных сооружений Москвы. Прослежена динамика изменения химических форм азота под воздействием микроорганизмов цикла азота (аммонификаторов, нитрификаторов, денитрификаторов, азотфиксаторов) при смене температурных режимов на последовательных стадиях компостирования, которое длилось 98 сут. В активный период компостирования на 6–10-е сут наблюдали значительную эмиссию аммиака ($553\text{--}861\text{ мг м}^{-3}$) и оксида азота ($67\text{--}86\text{ мг м}^{-3}$), многократно превышавшую нормативные показатели для выбросов в атмосферу. Микробиологическими методами было определено общее микробное число аэробных гетеротрофных микроорганизмов в компостируемой массе, а также количество КОЕ азотфиксаторов, присутствие и активность культивируемых нитрификаторов и денитрификаторов. На основе данных ПЦР в реальном времени и NGS профилирования по 16S рРНК изучено таксономическое разнообразие микроорганизмов, участвующих в компостировании (бактерий, грибов, архей), и выявлены закономерности сукцессии сообщества микроорганизмов в ходе процесса. Лабораторные эксперименты показали имеющийся потенциал к дальнейшему разложению органических веществ сброженного осадка, возможно, недоступных микроорганизмам в анаэробных условиях, но поддающихся деградации аэробной микробиотой с получением продукта, стимулирующего рост растений и содержащего азот в формах общего 2.3% , аммонийного 890 мг кг^{-1} и нитратного 3750 мг кг^{-1} .

Ключевые слова: компостирование, обезвоженные анаэробно обработанные осадки сточных вод, аммонификация, нитрификация, гетеротрофные аэробные микроорганизмы, ПЦР

DOI: 10.31857/S0026365620040096

В настоящее время большое значение имеют исследования и применение методов биодеградации твердых органических отходов, включая органическую фракцию твердых коммунальных отходов (ТКО), направленные на интенсификацию процесса разложения и повышение его безопасности для окружающей среды, а также на получение удобрений. Захоронение ТКО, включая осадки сточных вод (ОСВ) экологически небезопасно. На крупных современных станциях очистки сточных вод Москвы и некоторых других городов проводится стабилизация ОСВ путем их анаэробной обработки в метантенках при температуре $52\text{--}53^\circ\text{C}$. При этом уничтожаются патогены, и из легко разлагаемых органических веществ (ОВ) образуется биогаз, состоящий, в основном, из метана и углекислоты. Сброженная биомасса осадков после обез-

воживания на центрифугах (декантерах) является анаэробно сброженным ОСВ (АнОСВ), и эти отходы размещаются на полигонах ТКО или используются при рекультивации отработанных карьеров, а также, частично, в качестве субстрата для приготовления биопочв для озеленения городов и в лесопосадках. Ежегодно в Москве на очистных сооружениях образуются миллионы тонн осадков (Пахненко, 2015). Следует отметить, что в России только в нескольких городах на станциях очистки сточных вод имеются метантенки. В основном сырые осадки сточных вод вывозятся на полигоны ТКО. Из-за неполноты биоразложения органических веществ в анаэробных условиях АнОСВ, даже сброженные в метантенках, характеризуются высоким остаточным содержанием вредных и дурно пахнущих органических веществ, что требует даль-

нейшей обработки АНОСВ (Meissl, Smidt, 2007). Наиболее эффективным методом получения биопочвы из АНОСВ является промышленное компостирование в камерных установках в смеси с углеродосодержащими отходами, такими как древесная щепа после санитарной обрезки деревьев и кустарников, а также листовой опад, отходы производства бумаги и картона. Компостирование является экзотермическим процессом микробного окисления, в котором органический субстрат подвергается биодegradации сложной популяцией микроорганизмов в условиях оптимальной влажности и наличия кислорода. В компостировании участвует множество микроорганизмов: идентифицировано более 2000 известных видов бактерий, не менее 100 видов грибов, а также археи, при этом большинство микроорганизмов в микробном сообществе компоста представлено некультивируемыми видами (De Gannes et al., 2013; Sánchez et al., 2017; Ножевникова и соавт., 2019). На разных температурных стадиях процесса компостирования (мезофильная, термофильная, остывание и созревание) активны представители различных микробных групп (Pere et al., 2013). Большинство исследований направлено на выявление активных аэробных микроорганизмов при компостировании в целях оптимизации и управления процессом биодegradации органических веществ.

При компостировании происходит трансформация азота посредством следующих микробных процессов цикла азота, а именно: аммонификации, ассимиляции (или иммобилизации), нитрификации и денитрификации (Meng et al., 2016). Потери азота при компостировании происходят при образовании летучего аммиака и оксидов азота (Saceres et al., 2018). В то же время, аммиак может быть преобразован в азотсодержащие иммобилизованные в компосте соединения (Sasaki et al., 2004; Vazquez et al., 2018). Ассимиляция аммиака бактериями является одним из ключевых процессов трансформации азота. Однако этот процесс применительно к компостированию АНОСВ недостаточно исследован.

Снижение содержания NH_3 в атмосфере компоста до нетоксичных для микроорганизмов уровней может способствовать нитрификации (Mena et al., 2003; Wang et al., 2015). Ключевую роль в ней играют нитрифицирующие бактерии и археи, активность которых обнаружена при компостировании в условиях интенсивной аэрации (Kowalchuk et al., 1999; Oishi et al., 2012; Zeng et al., 2013). Исследованиями Vanegas и соавт. (2007) показана сравнительная зависимость скорости минерализации ОВ различных осадков сточных вод от объема в смеси древесных опилок, но дальнейших микробиологических исследований работа не получила.

Таким образом, целью данной работы явилось комплексное исследование динамики изменения при термофильном компостировании биологических, физико-химических и агрономических свойств смеси анаэробно обработанного осадка сточных вод и древесной щепы, а также изучение активности, состава и изменения во времени микробного сообщества, участвующего в процессе компостирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Субстратом для компостирования служили обезвоженные и предварительно анаэробно обработанные в термофильном метантенке АНОСВ на Люберецких очистных сооружениях Москвы. Перед компостированием АНОСВ смешивали с древесной щепой (5–10 мм) лиственных пород в соотношении 2 : 1.35 по массе для достижения оптимального для компостирования значения С/Н 25 (Castaldi et al., 2009). Влажность поддерживали на уровне 55–60%.

Процесс компостирования проводили в течение 98 сут, в том числе первые 28 сут активной фазы процесса (Castaldi et al., 2009), в лабораторных условиях с использованием двухкамерного био-реактора аэробной твердофазной биодegradации органических отходов (рис. 1) рабочим объемом 50 дм³. Компостную смесь аэрировали с интенсивностью 0.04 л воздуха мин⁻¹ кг⁻¹ сухого беззольного вещества за счет создаваемого компрессором разрежения и притока атмосферного воздуха через ограждения внутрь камеры, что моделировало естественную аэрацию компостных буртов (Ivankin et al., 2014). Измерение газового состава атмосферы субстрата производили при помощи газоанализатора ОКА-92МТ (“Информаналитика”, Россия). Ежедневно анализировали состав отходящих газов на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия) по показателям содержания CO_2 и O_2 . Пробы для хроматографии отбирали вручную.

Температура воздуха в камере поддерживалась автоматически на уровне текущего значения $\pm 0.2^\circ\text{C}$ температуры компостируемого материала при помощи нагревательного элемента и измерителя-регулятора ИВТМ-7/2С (“Эксис”, Россия).

Мониторинг температурного и газового режимов, а также отбор проб для микробиологических исследований производили каждые 7-е сут в течение активной фазы процесса (всего 5 проб). Пробы для исследования физико-химических и агрономических свойств отбирали, начиная с первого дня эксперимента, и далее на 7, 14, 21, 28, 56 и 98 сут. Для всех образцов проб по общепринятым и модифицированным методикам были измерены следующие параметры: рН; влажность термовиметрическим методом на анализаторе влажно-

сти ЭВЛАС-2М (“Сибагроприбор”, Россия); содержание общего органического углерода (С, %) термogrавиметрическим методом с использованием муфельной печи ПМ-16М-1200 (“МТ-Эталон”, Россия) (Navarro et al., 1993); общего азота (белкового и аммонийного) по Кьельдалю (N, %) в сухом веществе с использованием автоматического титратора Easy Plus (“Mettler Toledo”, Швейцария); водорастворимых аммонийного (N-NH₄) и нитратного (N-NO₃) азота (Vanegas et al., 2007; Castaldi et al., 2009); индекс прорастания (ИП, %) (Cesaro et al., 2015); рассчитано отношение С/Н. Для определения водорастворимых веществ, рН и индекса прорастания использовали 10 г образца, ресуспендированного в 300 мл дистиллированной воды (Zorpas, Loizidou, 2008). Измерения рН проводили на лабораторном анализаторе АНИОН 4150 (“Ифраспак-Аналит”, Россия). Концентрацию N-NH₄ и N-NO₃ азота определяли с использованием спектрофотометра Nach Lange DR 5000 (Германия): аммоний с реактивом Несслера, нитратный азот — методом, основанном на восстановлении кадмия, согласно инструкции по работе спектрофотометра Nach Lange DR 5000. Влияние компоста на рост растений оценивали по прорастанию семян и длине корней редьки посевной (*Raphanus sativus*) на основании подсчета индекса прорастания (ИП, %) (Cesaro et al., 2015).

Выявление основных микробных групп, вовлеченных в цикл азота и принимающих участие в процессах компостирования на разных температурных стадиях, проводили путем посева образца компостируемой массы на питательные среды. Образцы биомассы массой 1 г ресуспендировали в 10 мл стерильной водопроводной воды со стеклянными бусинами, встряхивали на Bio Vortex VI (“Biosan”, Латвия) в течение 30 с, разводили в 10 раз и производили посев на стерильные селективные питательные среды с дальнейшей инкубацией в течение 5 сут при температурах 30 и 55°C. Азотфиксаторы выращивали на среде Эшби следующего состава (г/л дистиллированной воды): сахароза — 20; K₂HPO₄ — 0.2; MgSO₄ · 7H₂O — 0.2; NaCl — 0.2; K₂SO₄ — 0.1; CaCO₃ — 5.0. На 1 л среды дополнительно вносили 1 мл раствора микроэлементов по Федорову следующего состава (г/л дистиллированной воды): H₃BO₃ — 5.0; NH₄Cl — 5.0; Na₂MoO₄ · 2H₂O — 5.0; ZnSO₄ · 7H₂O — 0.2; KI — 0.5; NaBr — 0.5; Al₂(SO₄)₃ · 18H₂O — 0.3. Нитрификаторы выращивали на средах Виноградского для I и II стадий нитрификации соответственно. Состав среды для I стадии (г/л водопроводной воды): (NH₄)₂SO₄ — 2.0; K₂HPO₄ — 1.0; MgSO₄ · 7H₂O — 0.5; NaCl — 2.0; FeSO₄ · 7H₂O — 0.05; CaCO₃ — 5.0. Состав среды для II фазы (г/л водопроводной воды): NaNO₂ — 1.0, K₂HPO₄ — 0.5; MgSO₄ · 7H₂O — 0.5; NaCl — 0.5; FeSO₄ · 7H₂O — 0.4; Na₂CO₃ — 1.0. К

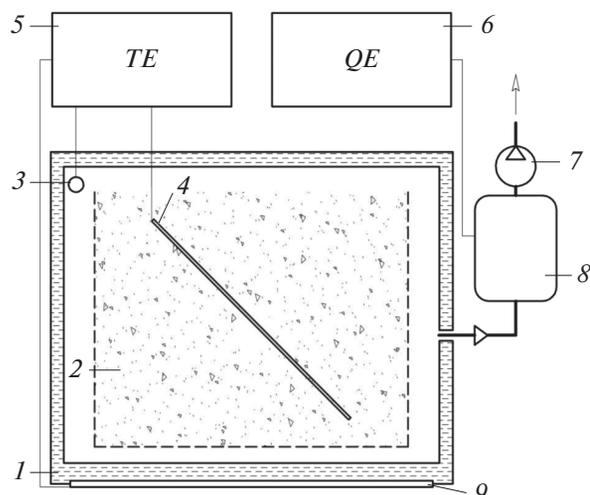


Рис. 1. Принципиальная схема лабораторного биореактора аэробной твердофазной биодеградации органических отходов: 1 — камера компостирования; 2 — компостная смесь; 3, 4 — сенсоры температуры; 5 — измеритель-регулятор температуры; 6 — газоанализатор; 7 — компрессор; 8 — сенсоры газов; 9 — нагревательный элемент.

обеим средам добавляли в расчете 1 мл на 1 л среды раствор микроэлементов по Пфеннигу следующего состава (мг/л дистиллированной воды): ЭДТА — 500; FeSO₄ · 7H₂O — 200; ZnSO₄ · 7H₂O — 10; MnCl₂ · 4H₂O — 3; H₃BO₃ — 30; CoCl₂ · 2H₂O — 20; CuCl₂ · 2H₂O — 1; NiCl₂ · 6H₂O — 2; Na₂MoO₄ · 2H₂O — 3; рН 6). Денитрификаторы выращивали на среде Гильята следующего состава (г/л дистиллированной воды): цитрат натрия трехзамещенный — 5.0; KNO₃ — 2.0; аспарагин — 1.0; KH₂PO₄ — 2.0; MgSO₄ · 7H₂O — 2.0; CaCl₂ · 6H₂O — 0.2; FeCl₃ · 6H₂O — 0.001; рН 7.0. Рост гетеротрофных микроорганизмов и азотфиксаторов оценивали путем подсчета колоний на агаризованной среде, описывали морфологическое разнообразие колоний и проводили микроскопирование при помощи светового микроскопа Zeiss Lab.A1 (“Carl Zeiss”, Германия), с цифровой камерой AxioCamHR. Для нитрификаторов, культивируемых в жидкой среде, оценку роста и активности проводили спектрофотометрически по изменению концентрации субстратов и образованию продуктов согласно методикам, описанным выше. Активность денитрификаторов, также культивируемых в жидкой среде, определяли по образованию газообразных продуктов (N₂, N₂O) на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (“Хроматек”, Россия). В качестве сорбента для определения N₂ использовали цеолит NaX 60/80 меш, а для определения N₂O — Porapak Q 80/100 меш. Длина стальной колонки составляла 3 м, внутренний диаметр — 2 мм, температура колонки — 60°C, температура испарителя — 200°C,

ДТП – 200°C, расход газа-носителя (аргона) – 25 мл мин⁻¹.

Подсчет общего микробного числа (ОМЧ) гетеротрофных аэробных микроорганизмов (ГАМ) производили методом высева десятикратных разведений (до 10¹² раз) суспензии компостируемой массы по 50 мкл каждого разведения в трех повторностях на богатую агаризованную питательную среду – обогаченную клостридиальную среду следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 13; пептон – 10; NaCl – 5; ацетат натрия – 3; глюкоза – 5; крахмал – 1; гидрохлорид цистеина – 0.5; вода дистиллированная; pH 7.0. Чашки со средой инкубировали при 30°C (мезофильные условия) или 55°C (термофильные условия) в течение 5 сут, после чего производили визуальный подсчет колоний на поверхности среды и соответствующий пересчет на 1 г компостируемой массы.

Флуоресцентная гибридизация *in situ*. Фиксацию и подготовку образцов для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) проводили согласно методике, описанной ранее (Ножевникова и соавт., 2012). Для гибридизации использовали меченый флуоресцентным красителем Су3 олигонуклеотидный зонд Nsm156 (5'-TAT TAG CAC ATC TTT CGA T-3'), специфичный по отношению к видам рода *Nitrosomonas* (Morgan et al., 1996). Процедура гибридизации проводилась при температуре 46°C по стандартной схеме (Amann et al., 1990). Содержание формамида в гибридизационном буфере составляло 5%. Синтез зонда осуществлялся компанией “Синтол” (Россия). Визуализацию образцов проводили с использованием микроскопа Zeiss Lab.A1 (“Carl Zeiss”, Германия) со светофильтром Zeiss 20 для Су3-меченых зондов.

Подсчет микроорганизмов с помощью ПЦР в реальном времени (qPCR). Для выделения ДНК из компоста использовали набор DNeasy PowerSoil Kit (“Qiagen”, Германия). ПЦР в режиме реального времени проводили в ПЦР буфере-Б (“Синтол”, Россия) в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I и пассивного референсного красителя ROX (“Синтол”, Россия) с использованием Системы ПЦР обнаружения реального времени CFX96 Touch™ (“Bio-Rad”, США). Для количественного определения содержания архей, бактерий и грибов в исследуемых образцах использовали следующие праймерные системы для гена *16S* рРНК или внутреннего транскрибируемого спейсера (internal transcribed spacer, ITS) в случае грибов: Arch 967F/Arch-1060R для архей (Bengtson et al., 2012), Eub338F/Eub518R для бактерий (Fierer et al., 2005), FR1/FF390 для грибов (Prevost-Bouere et al., 2011). Детекцию для каждого образца осуществляли в двукратной повторности. Для подсчета количества фило типов в анализируемых образцах сравнивали сигнал, полученный в

образце, со стандартной кривой. Для построения стандартных кривых применяли серию последовательных разведений стандартного образца, в качестве которого использовали предварительно очищенный с помощью набора WizardSV Gel and PCR Clean-Up System (“Promega”, США) и клонированный в pGEM-T вектор (“Promega”, США) целевой ПЦР-фрагмент. Количество целевых фило типов в анализируемых образцах рассчитывали на 1 мкг компоста.

Профиль сообщества микроорганизмов компоста по 16S рРНК. Для выделения тотальной ДНК использовали PowerSoil DNA Isolation Kit (“MoBio”, США). Процедуру проводили по протоколу, рекомендованному производителем. ДНК хранили при –20°C. Очищенный образец ДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) с парой универсальных праймеров для V3–V4 участков гена *16S* рРНК: 319F (5'-ACTCCTACGGGAGGCGAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Праймеры были дополнены идентифицирующими олигонуклеотидными последовательностями для секвенирования MiSeq (“Illumina”, США). Подготовка проб и собственно секвенирование производили согласно рекомендациям производителя. Для контроля качества прочтений использовали UPARSE (Edgar, 2013). Далее прочтения были сгруппированы по операционным таксономическим единицам (OTUs) по уровню сходства 97% с помощью USEARCH (Edgar, 2010). Таксономическое положение репрезентативной последовательности для каждого OTU было определено с использованием “RDP classifier” (Wang et al., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические параметры компостируемой массы AnOCB

Динамика изменения температуры авторазогрева в первые 28 сут компостирования (активная фаза), повторяла классическую зависимость (Ножевникова и соавт., 2019), а именно, наблюдали три стадии процесса – мезофильную, термофильную и стадию остывания (рис. 2). Далее, в течение 60 сут, субстрат окончательно стабилизировался без авторазогрева при температуре окружающей среды (стадия созревания).

В начале первых суток компостирование проходило в мезофильном режиме, за 48 ч компостирования температура возросла с 14.1 до 42.4°C. В этот период проходил активный гидролиз легкоразлагаемых субстратов мезофильными микроорганизмами (в том числе микроорганизмами из осадков сточных вод), что вызывало значительное поглощение кислорода в камере компостирования (концентрация снизилась с 21.0 до 11.4 об. % O₂, рис. 2) с выделением диоксида угле-

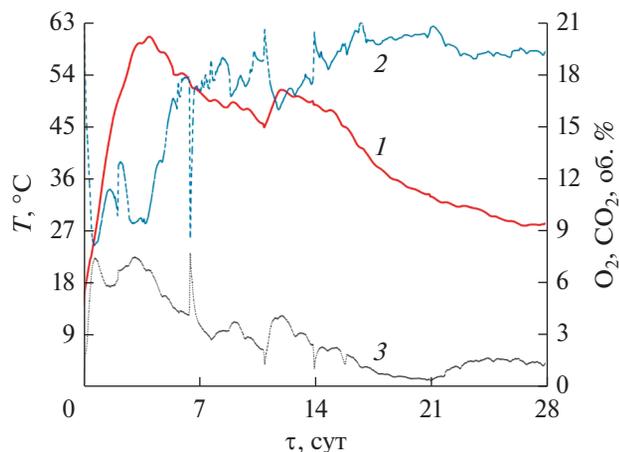


Рис. 2. Температурный и газовый профили при компостировании АнОСВ (активная фаза): 1 – динамика изменения температуры субстрата; 2 – концентрация кислорода в атмосфере субстрата; 3 – концентрация диоксида углерода.

рода (5.8 об. % CO₂, рис. 2) и воды. Активное разложение органических веществ вызвало повышение температуры компостируемой массы и создало условия для развития термофильных микроорганизмов.

Термофильный режим в компостируемом материале устанавливался на 3-и сут, температура повышалась до максимальной 60.6°C на 4-е сут компостирования, содержание O₂ снижалось до 10.2 об. %, а CO₂ увеличивалось до 6.8 об. % (рис. 2). Схожий термофильный режим при компостировании АнОСВ с опилками в открытых буртах описан в работе Vanegas и соавт. (2007). Высокая температура была обусловлена значительным снижением (на 2.7%) содержанием углерода в субстрате в этот период за счет активной аэробной деградации: с 37.3 до 34.6 ± 0.4% в сухом веществе (с.в.) (рис. 3). Вследствие процессов самоуплотнения субстрата, пористость его нижних слоев уменьшалась, что приводило к формированию анаэробных микрозон и, вероятно, обусловило прохождение одновременно нитрификации и денитрификации (Chowdhury et al., 2014). Нитраты, образовавшиеся на поверхности частиц компостируемого субстрата, посредством массопереноса перемещались внутрь частиц, где в анаэробных условиях восстанавливались до оксидов и молекулярного азота. Возможно, по этой причине содержание нитратного азота к 14-м сут значительно не изменилось, а атмосфера компоста содержала до 86.14 мг м⁻³ оксидов азота (по NO₂, рис. 4). Низкие концентрации нитратного азота на начальной стадии компостирования были отмечены и другими авторами (Vanegas et al., 2007; Castaldi et al., 2009).

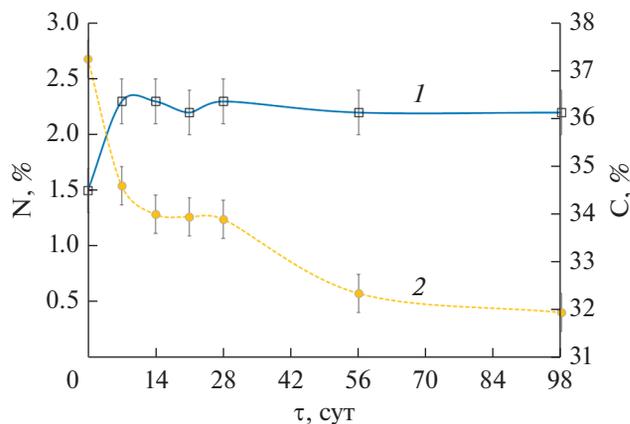


Рис. 3. Динамика изменения общего азота (1) и углерода (2) при компостировании АнОСВ.

Мезофильные денитрификаторы, обнаруженные на всех стадиях процесса, в периоды с 7 по 14 сут и с 21 по 28 сут росли наиболее активно, что обусловило денитрификацию и появление оксидов азота в атмосфере компоста на 21–23 сут в количестве 50–70 мг NO₂ м⁻³ (рис. 4). Наши наблюдения согласуются с результатами исследований, в которых показано, что вследствие сопротивления массопереносу концентрация растворенного кислорода начинает уменьшаться на глубине 0.3–0.4 мм от поверхности частицы субстрата, таким образом, до 75% объема каждой частицы находится в анаэробных условиях, что замедляет процессы аэробной биodeградации (Wang et al., 2015).

В то же время, исчерпание доступных субстратов, видимо, начинало лимитировать активность термофильных микроорганизмов, что вызывало снижение скорости разложения органических веществ, о чем свидетельствует повышение концентрации O₂ до 19.4 об. % и уменьшение концентрации CO₂ до 1.9 об. % и, как следствие, охлаждение субстрата до 44.9°C на 11-е сут.

С 6-х по 11-е сут наблюдали интенсивное образование аммиака, вызванное, вероятно, активной аммонификацией белков погибшей биомассы микроорганизмов сброженного осадка. Интенсифицировала выход NH₃ также высокая скорость потребления биологически доступного углерода и его низкое исходное содержание в древесной щепе в начальный период компостирования. Это привело к нехватке углерода в субстрате для ассимиляции его микробиотой и, как следствие, к минерализации азота в форме NH₃ в условиях высокой температуры автотермогрева (рис. 2 и 4). Аммонификация, потеря влаги, повышение температуры и pH являются причинами выбросов NH₃ (Rihani et al., 2010). В то же время, наблюдали увеличение процентного содержания общего азота в этот период с 1.5 ± 0.2% с. в. до 2.3 ± 0.2% с.в. на 7-е сут (рис. 3),

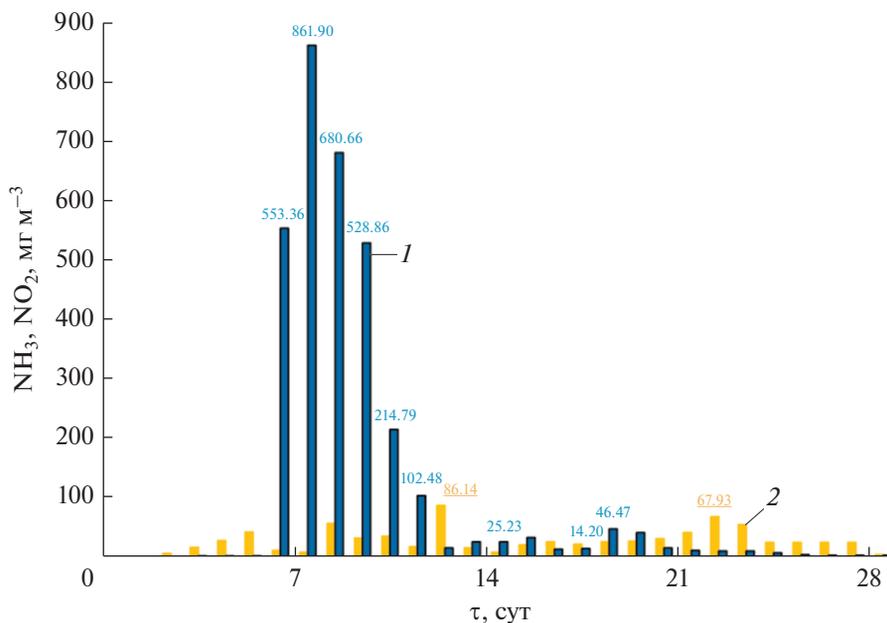


Рис. 4. Эмиссия аммиака (1) и оксидов азота (2) при компостировании АНОСВ (активная фаза).

т.е. на 53%, что было связано с потерей массы органического вещества в результате деградации. В сравнении с азотом, минерализация углерода идет значительно интенсивней, поэтому концентрация азота в относительных единицах возрастает при уменьшении его абсолютного значения за счет потерь (Vanegas et al., 2007; Rihani et al., 2010).

Уровень pH в период с 6-х по 11-е сут увеличился до 8.54 (рис. 5), вероятно, вследствие увеличения содержания аммонийного азота в субстрате с 910 до 1430 мг N-NH₄ кг⁻¹ (рис. 6). Концентрация аммиака в атмосфере субстрата на 7-е сут достигала наибольшего значения 861.9 мг NH₃ м⁻³ и далее на 10 сут компостирования снизилась до 102.48 мг NH₃ м⁻³ (рис. 4). Значительная эмиссия

аммиака в течение активной фазы компостирования АНОСВ согласуется с результатами других исследователей (Rincón et al., 2019). Дальнейшее его снижение до нетоксичной для микроорганизмов концентрации способствовало началу нитрификации (Mena et al., 2003; Wang et al., 2015). Так, содержание нитратного азота на 21-е сут увеличилось с первоначальных 730 до 1130 мг N-NO₃ кг⁻¹. В то же время, содержание общего азота осталось на прежнем уровне N 2.3% с.в., видимо, за счет приращения белкового азота биомассы термофильных микроорганизмов.

После замедления биодеградации и снижения температуры до 44.9°C на 11-е сут следовало повторное ускорение реакций разложения ОВ, при-

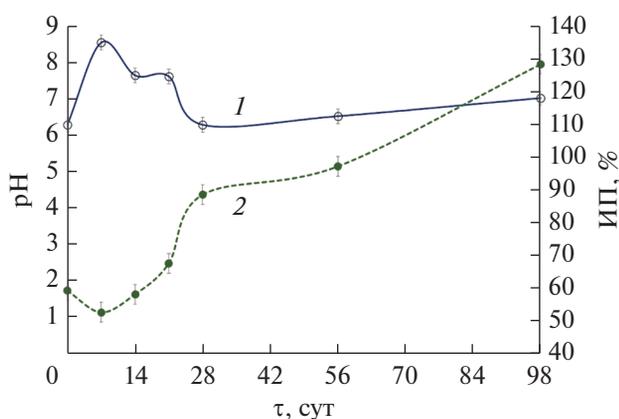


Рис. 5. Динамика изменения pH (1) и индекса прорастания (2) при компостировании АНОСВ.

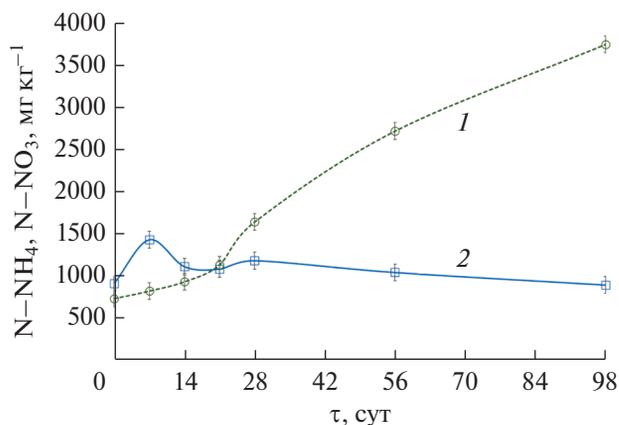


Рис. 6. Динамика изменения нитратного (1), аммонийного (2) азота при компостировании АНОСВ.

ведшее к снижению уровня O_2 до 17.2 об. %, выделению диоксида углерода CO_2 (3.5 об. %) и повторному росту температуры до $50.4^\circ C$ на 13-е сут. Далее температура плавно снижалась (фаза остывания) до $42.9^\circ C$ при снижении потребления O_2 и выделения CO_2 на 17-е сут (рис. 2), что привело к началу восстановления популяции мезофильных микроорганизмов.

В период остывания субстрата концентрация аммиака сохранялась на уровне $15\text{--}25 \text{ мг } NH_3 \text{ м}^{-3}$. Процессы нитрификации и ассимиляции азота конкурировали за аммиак, и оба процесса снижали его эмиссию.

На 28-е сут компостирования температура понизилась до $28.4^\circ C$ при содержании O_2 и CO_2 , соответственно, 19.4 и 1.4 об. %. Снижение температуры компостируемой массы до разницы $+10^\circ C$ к температуре окружающей среды свидетельствовало о завершении активной фазы компостирования и начале стадии созревания, которая обычно длится до 6 месяцев, в зависимости от принятой технологии, с получением полностью стабильного продукта – компоста (Meissl, Smidt, 2007).

После стадии активного разложения компостирование субстрата продолжалось до наступления 98 сут с момента начала процесса. Компостирование проводили в мезофильных условиях при температуре, равной температуре окружающей среды $22\text{--}25^\circ C$. Изменение концентрации кислорода и эмиссия исследуемых газов в этот период были видимо ниже уровня детекции приборов.

Содержание общего органического углерода за 98 сут компостирования уменьшалось с 37.25 ± 0.4 до $31.95 \pm 0.4\%$ с. в., что согласуется с ранее полученными данными (Vanegas et al., 2007), а соотношение C/N снижалось до 15, что является показателем готовности компоста и соответствует предыдущим данным (Castaldi et al., 2009).

В результате улетучивания аммиака и его окисления до нитратов уровень pH снижался до 6–7 на 21–28 сут (рис. 5). Ранее было показано, что снижение уровня pH способствовало росту грибов и расщеплению лигнина и целлюлозы (Nashicha et al., 2009). Содержание аммонийного азота снизилось до $890 \text{ мг } \text{кг}^{-1}$, а нитратного, наоборот, возросло до $3750 \text{ мг } \text{кг}^{-1}$ (рис. 6). Компостирование уменьшило количество аммония, но увеличивало количество нитратов за счет ускорения процессов нитрификации. Этот эффект наблюдали и другие исследователи (Vanegas et al., 2007). Итоговое соотношение $N-NH_4/N-NO_3$ в компосте составляло 0.24, что также являлось показателем его готовности (Castaldi et al., 2009). Также, на стадии созревания (98 сут) уровень pH компостной массы составлял около 7, что предполагало образование в компосте гуминовых веществ, которые действовали как буферы.

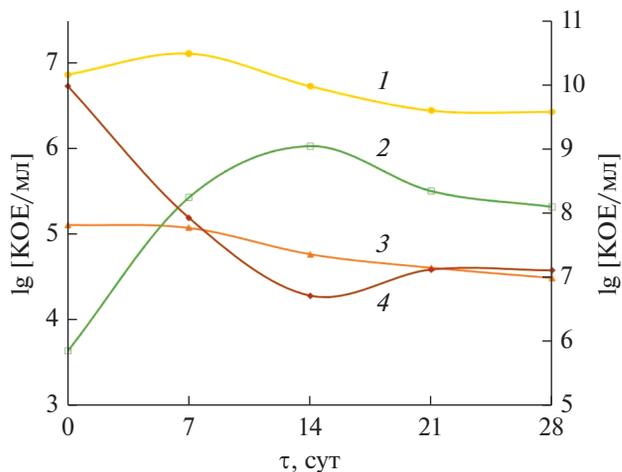


Рис. 7. Изменение состава групп микробного сообщества при компостировании АНОСВ (1–3 – по данным qPCR; 4 – исследования ОМЧ ГАМ методом культивирования): 1 – бактерии; 2 – грибы; 3 – археи; 4 – гетеротрофные копиотрофы.

В течение срока компостирования действие субстрата на тестовое растение менялось от ингибирующего его рост до стимулирующего (рис. 5), причем 28 сут компостирования АНОСВ достаточно для потери субстратом фитотоксичности.

Микробиологические исследования компостируемой массы АНОСВ

Динамика изменения ОМЧ. В нашей работе показано, что динамика изменения ОМЧ гетеротрофных аэробных микроорганизмов (ГАМ) зависела от изменения температуры в компостируемой массе. В начале процесса компостирования количество гетеротрофных аэробов было наибольшим и достигало $9.4 \times 10^9 \text{ КОЕ } \text{см}^{-3}$ ($\lg[\text{ОМЧ}] = 9.97$) (рис. 7). После того как на 4-е сут температура превысила $60^\circ C$, ОМЧ ГАМ снижалось на два порядка – до $8.4 \times 10^7 \text{ КОЕ } \text{см}^{-3}$ на 7-е сут ($\lg[\text{ОМЧ}] = 7.92$). Высокая температура привела к инактивации (переходу в покоящиеся формы, частичной гибели) мезофильной микробиоты. С 7 по 14 сут ОМЧ ГАМ снижалось до $5.2 \times 10^6 \text{ КОЕ } \text{см}^{-3}$ ($\lg[\text{ОМЧ}] = 6.71$) на 14-е сут.

Активность нитрификаторов. Активность культивируемых нитрифицирующих микроорганизмов первой и второй стадий нитрификации была отмечена лишь на начальной стадии процесса. При периодическом культивировании на среде Виноградского в мезофильных условиях стабильное снижение концентрации аммония в среде было отмечено для проб на нулевые и седьмые сутки (рис. 8). В то же время по данным FISH присутствие активных нитрификаторов первой стадии отмечалось не только в первые 7 сут компостирования

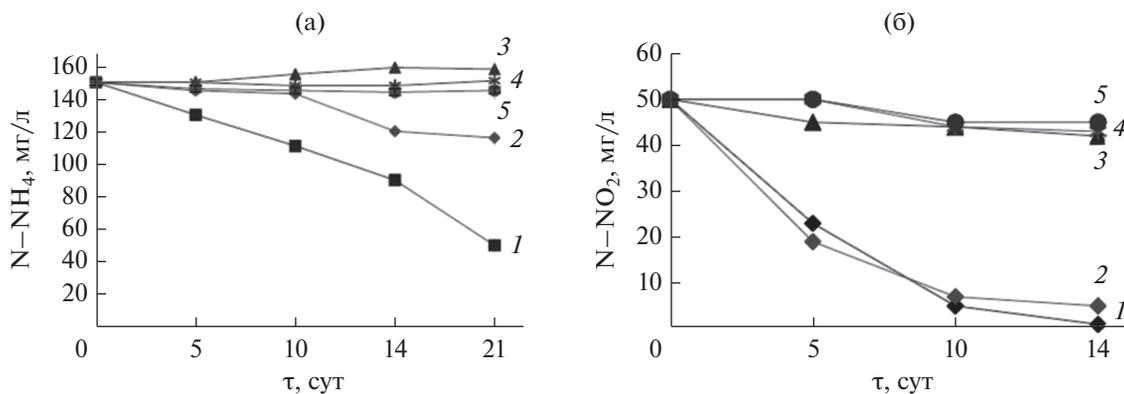


Рис. 8. Окисление аммония (а) и нитрита (б) нитрифицирующими бактериями при периодическом культивировании в пробах, отобранных на разных стадиях компостирования: 1 – первые сутки; 2 – 7 сут; 3 – 14 сут; 4 – 21 сут; 5 – 28 сут.

ния, но и в последних проанализированных пробах (28 сут) и составляло от 5.5×10^4 кл. $г^{-1}$ компостной массы в начале процесса и до 7.5×10^4 кл. $г^{-1}$ компостной массы в финальной точке. Полученные данные коррелируют с ранее опубликованными сведениями о максимальной активности аэробных аммоний-окисляющих бактерий на стадии созревания компоста (Kowalchuk et al., 1999; Oishi et al., 2012; Zeng et al., 2013). К тому моменту, когда компостируемый материал достиг температуры $55^\circ C$, представители этой группы, по-видимому, перешли в состояние покоя. Период инкубации при периодическом культивировании, вероятно, был недостаточно длительным, чтобы способность к окислению аммония восстановилась на прежнем уровне.

Активность азотфиксаторов. Мезофильные азотфиксаторы в сообществе микроорганизмов компостируемого материала присутствовали в течение всего процесса компостирования, хотя оптимальная температура для их жизнедеятельности устанавливались в первые 2 сут и после 14 сут компостирования. Количество КОЕ культивируемых мезофильных азотфиксаторов на всем протяжении компостирования оставалось на уровне 1.0×10^5 – 1.5×10^5 КОЕ $см^{-3}$, что говорит о способности данной группы микроорганизмов переживать неблагоприятные для них условия термофильной стадии компостирования.

Термофильные азотфиксаторы были обнаружены с начала опыта и по 14-е сут компостирования, КОЕ культивируемых термофильных азотфиксаторов составило 1.0×10^3 КОЕ $см^{-3}$, что на два порядка ниже, чем число мезофильных азотфиксаторов. В фазе остывания (21 и 28 сут) наблюдали некоторое восстановление ОМЧ ГАМ в близких значениях для этих точек – в среднем до 1.3×10^7 КОЕ $см^{-3}$ ($lg[OMЧ] = 7.11$).

Молекулярно-генетическое исследование таксономического разнообразия микробиоты компостируемой массы АНОСВ

Общие показатели биоразнообразия. О числе представителей определенной группы в образце компостируемого материала можно косвенно судить, основываясь на количества копий гена, образующихся в ходе ПЦР, последовательность которого соответствует конкретному домену (археи, бактерии, эукариоты).

В данной работе мы исследовали также разнообразие грибов как представителей домена эукариот. Результаты ПЦР в реальном времени проиллюстрированы на рис. 9. Подсчет численности микробного сообщества компоста методом ПЦР в реальном времени в этом случае не соответствовал результатам подсчета ОМЧ, так как на богатой питательной среде образуются колонии только культивируемых гетеротрофных копитрофов, способных сформировать колонию за 5 сут, в то время как метод ПЦР в реальном времени выявляет все группы микроорганизмов, в том числе некультивируемые. В то же время данным методом невозможно различать живые и мертвые клетки, таким образом, в подсчет также частично попадала биомасса погибших микроорганизмов метаногенного сообщества АНОСВ, генетический материал которой частично сохранился на момент отбора пробы.

По показателю количества копий гена 16S рРНК и ITS грибов, максимальную общую численность микроорганизмов сообщества компоста наблюдали на 7-е сут (1.34×10^7 копий гена $мкг^{-1}$), что можно связать с наиболее активным размножением и скоростью метаболизма аэробных термофильных микроорганизмов. Начиная с 21-х сут, численность микроорганизмов, включая грибы, стабилизировалась и оставалась примерно на одном уровне до 28-е сут (3.16×10^6 и 2.94×10^6 копий гена $мкг^{-1}$ соответственно). Это

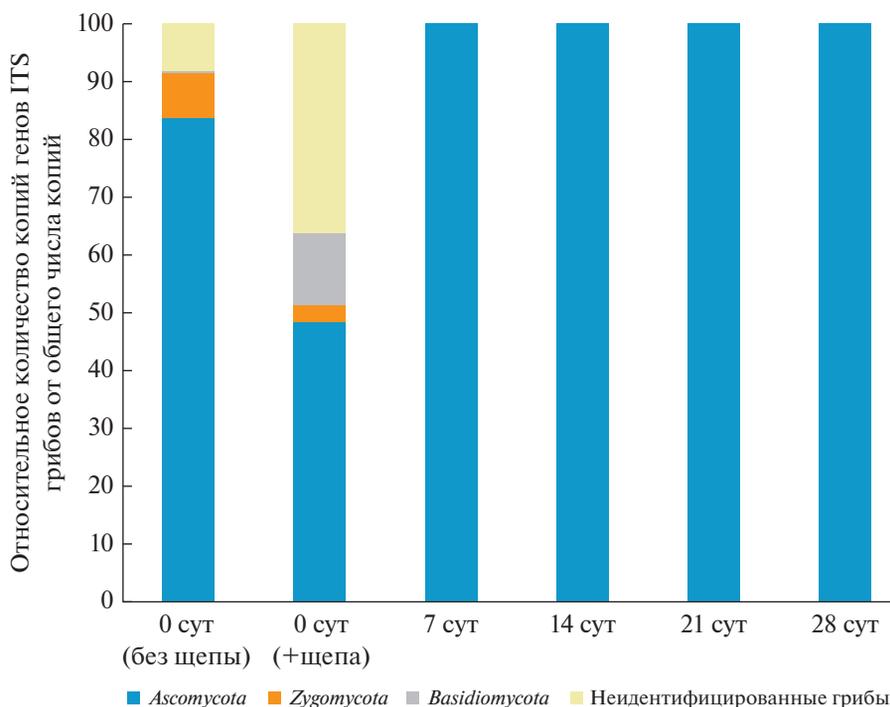


Рис. 9. Соотношение копий ITS представителей различных таксономических групп грибов при компостировании АНОСВ в пробах, отобранных в первые сутки (до и после добавления древесной щепы), 7, 14, 21 и 28 сут.

происходило в связи с расходом легкодоступного субстрата и переходом к утилизации трудноусваиваемых веществ, что привело к инактивации клеток микроорганизмов.

Разнообразие грибов в компостируемой массе АНОСВ. Среди грибов сообщества много неопознанных родов из разных таксонов (*Sordariomycetes*, *Microascaceae*). В материале со щепой перед началом компостирования наблюдали большое разнообразие родов грибов – 13 представителей из отделов *Ascomycota*, *Zygomycota* и *Basidiomycota* с долей от 1 до 8%, при этом отсутствовал определенный доминирующий род. На 14 и 28 сут в сообществе доминировал род *Pseudogymnoascus* (46 и 30% соответственно). Отдел *Ascomycota* сильно превалировал над другими отделами, начиная с 7-х сут компостирования (рис. 9), что также показано в работах Zhang и соавт. (2016) и Galitskaya и соавт. (2017). Грибное сообщество анализировали при помощи подсчета копий ITS. В грибном сообществе первое время наблюдали активный рост и увеличение числа ITS: за 7 сут число копий ITS возросло с 4.40×10^3 до 2.70×10^5 копий ITS мкг^{-1} . Дальнейшие количественные изменения числа копий ITS имели менее резкий характер. На 14-е сут наблюдали наибольшее число ITS грибов по сравнению с другими стадиями процесса (1.07×10^6 копий ITS грибов мкг^{-1}), что составляло 16.4% от общего числа микроорганизмов. На 21-е сут количество копий ITS грибов уменьшалось на

порядок и составило 3.20×10^5 копий ITS мкг^{-1} . К 28 сут значительных изменений в числе копий ITS грибов не было обнаружено, порядок значения оставался неизменным.

Разнообразие архей в компостируемой массе АНОСВ. Количество копий гена 16S рРНК архей в ходе компостирования уменьшалось примерно на порядок, по сравнению с их числом в субстрате до компостирования; возрастания числа представителей филума не происходило. Археи, видимо, не оказывали значительного влияния на процесс компостирования, и, вероятно, сохранялись за счет образования покоящихся форм, в которых переживали неблагоприятные условия. Осадок сточных вод был предварительно анаэробно сброжен, что привело к развитию анаэробных архей, однако в условиях аэробного процесса их жизнедеятельность ингибировалась.

Разнообразие бактерий в компостируемой массе АНОСВ. В ходе анализа результатов было обнаружено, что бактерии преобладали на всех стадиях компостирования (рис. 10). Доля их последовательностей составляла 82–98% всех последовательностей генов эукариот и прокариот микробиоты компостируемого материала. Так как число копий генов бактерий преобладает в смеси, именно бактериальное сообщество определяет динамику изменения численности сообщества микроорганизмов в целом.

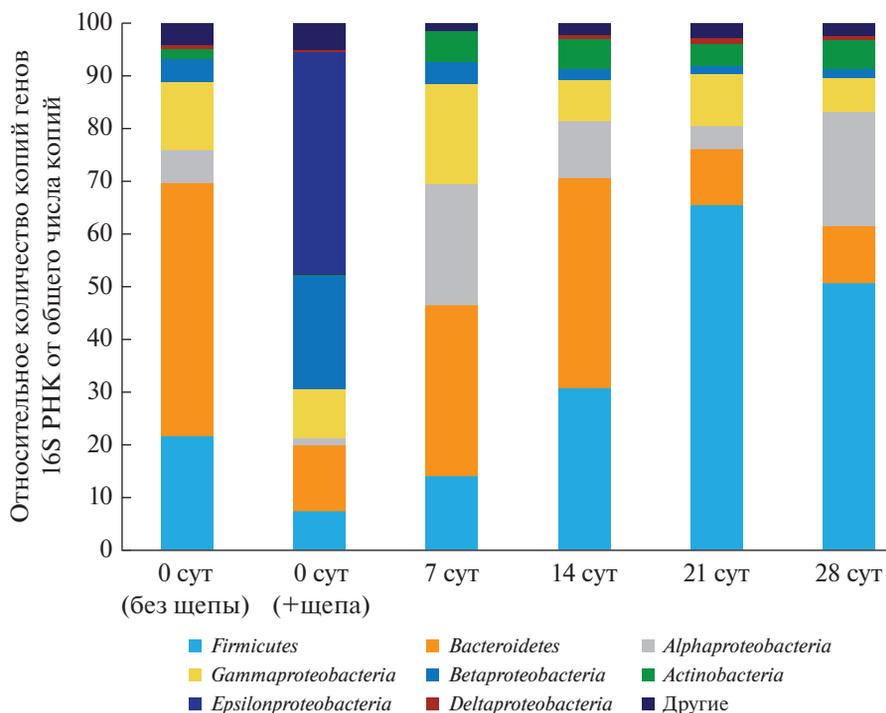


Рис. 10. Соотношение генов 16S рРНК представителей различных таксономических групп бактерий при компостировании АНОСВ в пробах, отобранных в первые сутки (до и после добавления древесной щепы), 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сут.

Результаты NGS профилирования иллюстрируют смену бактериальных сообществ при компостировании. Так, число представителей филума *Firmicutes* за 21 сут компостирования выросло с 8 до 65% от общего числа бактерий. Данная группа преобладала в бактериальном сообществе компоста на поздних стадиях процесса (14–28 сут). Максимальное число *Bacteroidetes* наблюдали до начала компостирования (47%) и на 14-е сут компостирования (40%). До начала компостирования в образце с добавлением щепы к АНОСВ обнаружилось большое количество бактерий группы ϵ -*Proteobacteria* (42%). При этом данная группа практически полностью отсутствовала в АНОСВ до добавления щепы, а также на всех стадиях компостирования: их доля составляла менее 0.01%. Это свидетельствует о том, что представители данной группы были привнесены с древесной щепой, но погибли после начала компостирования. Бактерии-представители γ -*Proteobacteria* присутствовали на всех стадиях процесса, наибольшую их долю наблюдали на 7-е сут (19%), после чего следовало уменьшение их количества до 6%. Значительную долю филума β -*Proteobacteria* наблюдали в начальной точке после добавления щепы, при этом не обнаружили корреляции между собственно АНОСВ и смесью АНОСВ и щепы. Представители групп *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* доминировали на ранних стадиях компостирования, а также в АНОСВ до начала аэробного процесса. Оби-

лие представителей филумов *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Firmicutes* в компостируемом субстрате отмечалось ранее в работе Antunes и соавт. (2016). Динамика соотношения трех данных филумов согласуется с результатами работы Zhang и соавт. (2016): численность *Firmicutes* за период компостирования (11 дней) увеличилась с 8 до 81%, в то время как количество *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* уменьшилось с 70 до 2 и 17% соответственно. Доля бактерий филума *Actinobacteria* варьировала в течение всего периода компостирования в пределах 4–6% от общего числа бактерий. Невысокие показатели численности филума были показаны в экспериментах Galitskaya и соавт. (2017), где относительное количество актинобактерий составляло 0.37–5.7%.

Важно отметить, что в сообществе компостируемой массы почти отсутствовали представители рода *Bacillus* — максимальная доля составила 1.5% на 21-е сут. Исследования микробиоты компоста из осадка сточных вод в работе Galitskaya и соавт. (2017) показал похожий результат. Однако в ряде других работ по компостированию отмечено доминирование данного рода (Zhang et al., 2016; Weglarz et al., 2018). Кроме того, наблюдали большее разнообразие таксонов бактерий на каждой стадии и отсутствие значительного преобладания конкретного рода по ходу созревания компоста — доля доминирующих родов на каждой стадии компостирования варьировала в интерва-

ле 10–38%. Интересно, что начальный субстрат до компостирования без добавления щепы значительно отличался по микробному составу от того же субстрата после смешения со щепой. Привнесенные со щепой микроорганизмы являются причиной подобного несоответствия. В обоих типах субстрата присутствовал только род *Coprothermobacter*, выделенный ранее из компоста с высоким содержанием белков и анаэробно сброженного осадка сточных вод (Etchebehere et al., 1998). *Coprothermobacter* – один из немногих анаэробных термофильных протеолитических родов бактерий. Представители рода эффективно расщепляют белки до водорода и ацетата, проводят аммонификацию на значительном уровне и при лимитировании субстрата, и при различной концентрации аммония в среде (0–6 г/л), что указано в работе Gagliano и соавт. (2015). Согласно результатам настоящего исследования, в смеси АНОСВ с древесной щепой и в АНОСВ без щепы доля гена 16S рРНК рода *Coprothermobacter* была равна 6 и 21% соответственно. Более того, протеолитический род *Coprothermobacter* присутствует в значительном количестве и на остальных стадиях компостирования (12.0–14.5% от общего числа микроорганизмов, рис. 11). Расщепляя белки, *Coprothermobacter* участвовал в активной эмиссии аммиака на 6–10 сут. Вместе с *Coprothermobacter* в субстрате без щепы преобладали роды *Arenibacter* (23%) и *Fluviicola* (7%), но они не обнаруживались в значимом количестве в субстрате с добавлением щепы. Аналогично, роды *Sulfurimonas* (38%) и *Simplicispira* (10%) обнаружены в большом количестве в АНОСВ со щепой и не являлись доминирующими в субстрате без щепы. Таким образом, микробиота компостной массы складывается в равной степени из микробиоты исходного субстрата и из микробиоты наполнителя, в данном случае – древесной щепы. При этом, микробиота наполнителя, судя по всему, может играть важную роль в запуске тех или иных процессов в компостируемой массе. На 7–21 сут процесса обнаружены микроорганизмы, способные расщеплять целлюлозу, – *Paenibacillus* (максимальное количество на 21 сут, 27% генов 16S рРНК). Представители данного рода обладают способностью утилизировать различные биополимеры (Kumar et al., 2012), некоторые члены способны к азотфиксации (Seldin et al., 1998). Также небольшую долю от общего количества генов составили копии гена представителей рода *Thermobispora* (2%), который обнаружился в период с 7 по 21 сут включительно, сохраняя свою первоначальную долю в сообществе. На 21-е сут был обнаружен род *Rhizobium* (2%), способный к азотфиксации, доля которого возрастала до 20% на 28 сут, что, вероятно может свидетельствовать о возрастании уровня метаболизма азота при созревании компоста. Роды *Fluviicola*, *Parapedobacter*, *Petrimonas*, *Chryseobacterium*, *Devosia*, *Cohnella* бы-

ли ранее обнаружены в сточных водах (Kampfer et al., 2003; Yang et al., 2014) и различных компостирующихся субстратах (Grabowski et al., 2005). *Devosia*, согласно ранее проведенным исследованиям, может служить маркером термофильного компостирования осадка сточных вод (Awasthi et al., 2017). Были обнаружены бактерии, потенциально способные к утилизации ароматических соединений (*Sphingobium*, *Flavobacterium*), однако их доля невелика: максимальное количество копий их гена обнаружили на 7-е сут – 5.4 и 6.2% соответственно.

Таким образом, анаэробно обработанный осадок сточных вод после частичного обезвоживания целесообразно компостировать с древесной щепой для окончательной стабилизации органических веществ в целях предотвращения негативного влияния на окружающую среду. Исходя из полученных данных о процессе компостирования АНОСВ и выявлении термофильных и мезофильных микроорганизмов на разных стадиях процесса, можно сделать вывод, что динамика изменения форм азота обусловлена функционированием сложных трофических связей микробиологического сообщества, приводящим к выходу азота из биополимеров. Активная биодеградация длится до 28 сут с эмиссией азотсодержащих веществ – аммиака до 862 мг м⁻³ и оксида азота до 86 мг м⁻³. Самоуплотнение субстрата и низкая концентрация кислорода в его атмосфере (до 8.0 об. %), вследствие потребления микроорганизмами, привели к возникновению частично анаэробных участков и активности обнаруженных мезофильных денитрификаторов с выделением продуктов денитрификации – оксидов азота. Азотфиксаторы начинают присутствовать в значимом количестве на стадии остывания компоста.

Причиной эмиссии значительных количеств аммиака может быть высокая скорость разложения белков погибшей в аэробных условиях биомассы микроорганизмов сброженного осадка при низкой первоначальной биологической доступности углерода древесной щепы (в основном за счет разложения гемицеллюлозы), а также высокая (более 60°C) температура авторазогрева. Так, высокая скорость потребления биологически доступного углерода и его низкое исходное содержание в древесной щепе в начальный период компостирования привела к нехватке С для ассимиляции микробиотой и, как следствие, минерализации азота в форме NH₃.

Биотехнологической задачей может быть стимулирование процессов нитрификации и ассимиляции азота, которые, конкурируя за аммиак, минимизируют его эмиссию. В то же время, отгонка избытка аммиака при компостировании и последующее его улавливание на водных скруберах, может, с одной стороны, снизить его концентрацию в суб-

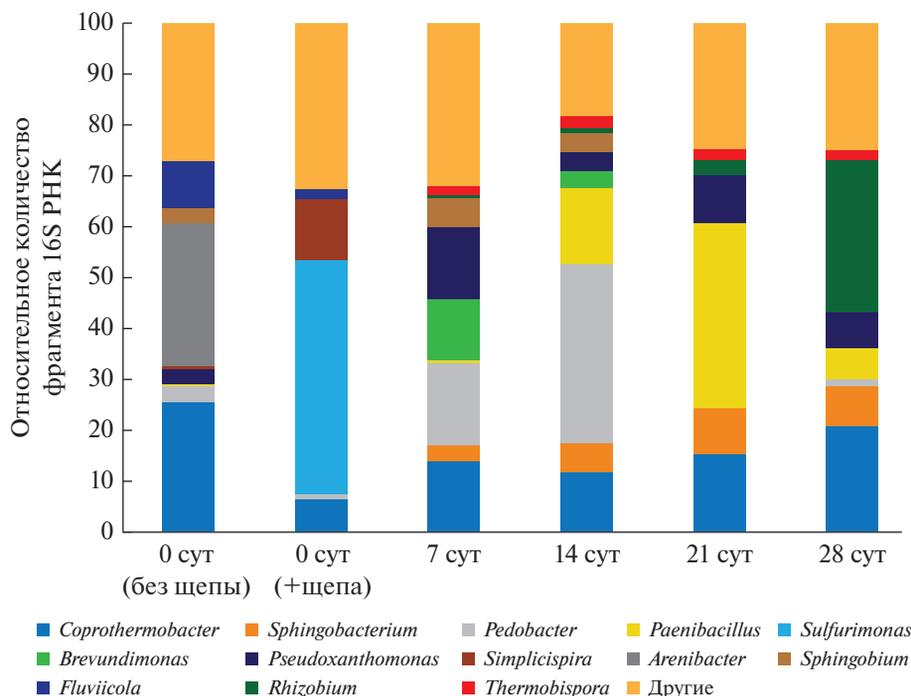


Рис. 11. Соотношение генов 16S рНК доминирующих родов бактерий при компостировании АНОСВ в пробах, отобранных в первые сутки (до и после добавления древесной щепы), 7, 14, 21 и 28 сут.

страте до нетоксичного для микроорганизмов уровня и стимулировать процессы нитрификации и ассимиляции, а с другой — обусловить получение аммиачной воды (гидрата аммиака), применяемой в качестве сырья при производстве минеральных удобрений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств проекта РФФИ МК-18-29-25035 и частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ножевникова А.Н., Литти Ю.В., Некрасова В.К., Куличевская И.С., Григорьева Н.В., Куликов Н.И., Зубов М.Г. Анаэробное окисление аммония (анаммокс) в биопленках иммобилизованного активного ила при очистке сточных вод с низкой концентрацией загрязнений // *Микробиология*. 2012. Т. 81. С. 28–28.
- Nozhevnikova A.N., Littti Y.V., Nekrasova V.K., Kulichevskaya I.S., Grigoryeva N.V., Kulikov N.I., Zubov M.G. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in immobilized activated sludge biofilms during the treatment of weak wastewater // *Microbiology (Moscow)*. 2012. V. 81. P. 25–34.
- Ножевникова А.Н., Миронов В.В., Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Русскова Ю.И. Состав микробного сообщества на разных стадиях компостирования, перспектива получения компоста из муниципальных органических отходов // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55. С. 211–221.
- Nozhevnikova A.N., Mironov V.V., Botchkova E.A., Littti Y.V., Russkova Y.I. Composition of a microbial community at different stages of composting and the prospects for compost production from municipal organic waste // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. P. 199–208.
- Пахненко Е.П. Осадки сточных вод и другие нетрадиционные органические удобрения. 3-е изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 314 с.
- Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. P. 1919–1925.
- Antunes L.P., Martins L.F., Pereira R.V., Thomas A.M., Barbosa D., Lemos L.N., Silva G.M., Moura L.M., Epamino G.W., Digiampietri L.A., Lombardi K.C., Ramos P.L., Quaggio R.B., de Oliveira J.C., Pascon R.C., Cruz J.B., da Silva A.M., Setubal J.C. Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics // *Sci Rep*. 2016. V. 6. Art. 38915.
- Awasthi M.K., Zhang Z., Wang Q., Shen F., Li R., Li D.-S., Ren X., Wang M., Chen H., Zhao J. New insight with the effects of biochar amendment on bacterial diversity as indicators of biomarkers support the thermophilic phase during sewage sludge composting // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 238. P. 589–601.

- Banegas V., Moreno J.L., Moreno J.I., Garcia C., Leon G., Hernandez T. Composting anaerobic and aerobic sewage sludges using two proportions of sawdust // Waste Manag. 2007. V. 27. P. 1317–1327.
- Bengtson P., Sterngren A.E., Rousk J., Archaeal abundance across a pH gradient in an arable soil and its relationship to bacterial and fungal growth rates // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 5906–5911.
- Caceres R., Malińska K., Marfa O. Nitrification within composting: a review // Waste Manag. 2018. V. 72. P. 119–137.
- Castaldi P., Garau G., Deiana P., Melis P. Evolution of carbon compounds during municipal solid waste composting: suitability of chemical and biochemical parameters in defining the stability and maturity of the end product // Dynamic Soil, Dynamic Plant. 2009. P. 17–31.
- Cesaro A., Belgiorno V., Guida M. Compost from organic solid waste: Quality assessment and European regulations for its sustainable use // Resour. Conservat. Recycl. 2015. V. 94. P. 72–79.
- Chowdhury M.A., de Neergaard A., Jensen L.S. Potential of aeration flow rate and biochar addition to reduce greenhouse gas and ammonia emissions during manure composting // Chemosphere. 2014. V. 97. P. 16–25.
- De Gannes V., Eudoxie G., Hickey W.J. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing // Bioresour. Technol. 2013. V. 133. P. 573–580.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // Nature Methods. 2013. V. 10. P. 996–998.
- Etchebehere C., Pavan M.E., Zorzopulos J., Soubes M., Muxi L. *Coprothermobacter platensis* sp. nov., a new anaerobic proteolytic thermophilic bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge // Int. J. Syst. Bacteriol. 1998. V. 48. P. 1297–1304.
- Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 4117–4120.
- Gagliano M.C., Bragaglia C.M., Petruccioli M., Rossetti S. Ecology and biotechnological potential of the thermophilic fermentative *Coprothermobacter* spp. // FEMS Microbiol. Ecol. 2015. V. 91. fiv018.
- Galitskaya P., Biktasheva L., Saveliev A., Grigoryeva T., Boulygina E., Selivanovskaya S. Fungal and bacterial successions in the process of co-composting of organic wastes as revealed by 454 pyrosequencing // PLoS One. 2017. V. 12. Article e0186051.
- Grabowski A., Tindall B.J., Bardin V., Blanchet D., Jeanthon C. *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 1113–1121.
- Hachicha S., Sellami F., Cegarra J., Hachicha R., Drira N., Medhioub K., Ammar E. Biological activity during co-composting of sludge issued from the OMW evaporation ponds with poultry manure – physico-chemical characterization of the processed organic matter // J. Hazard. Mat. 2009. V. 162. P. 402–409.
- Ivankin A., Pandya U., Saraf M. Intensification of aerobic processing of the organic wastes into compost // Composting for Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity / Ed. Maheshwari D. Springer, Cham. 2014. V. 3. P. 23–42.
- Kampfer P., Dreyer U., Neef A., Dott W., Busse H.-J. *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 93–97.
- Kowalchuk G.A., Naoumenko Z.S., Derikx P.J., Felske A., Stephen J.R., Arkhipchenko I.A. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 396–403.
- Kumar D., Ashfaque M., Muthukumar M., Singh M., Garg N. Production and characterization of carboxymethyl cellulase from *Paenibacillus polymyxa* using mango peel as substrate // J. Environ. Biol. 2012. V. 33. P. 81–84.
- Meissl K., Smidt E. High quality composts by means of co-composting of residues from anaerobic digestion // Compost Science & Utilization. 2007. V. 15. P. 78–83.
- Mena E., Garrido A., Hernández T., García C. Bioremediation of sewage sludge by composting // Commun. Soil Sci. Plant. 2003. V. 34. P. 957–971.
- Meng L., Li W., Zhang S., Wu C., Wang K. Effects of sucrose amendment on ammonia assimilation during sewage sludge composting // Bioresour. Technol. 2016. V. 210. P. 160–166.
- Mobarry B.K., Wagner M., Urbain V., Rittmann B.E., Stah D.A. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 2156–2162.
- Navarro A.F., Cegarra J., Roig A., Garcia D. Relationships between organic matter and carbon contents of organic wastes // Bioresour. Technol. 1993. V. 44. P. 203–207.
- Oishi R., Tada C., Asano R., Yamamoto N., Suyama Y., Nakai Y. Growth of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in cattle manure compost under various temperatures and ammonia concentrations // Microb. Ecol. 2012. V. 63. P. 787–793.
- Pepe O., Ventrino V., Blaiotta G. Dynamic of functional microbial groups during mesophilic composting of agro-industrial wastes and free-living (N₂)-fixing bacteria application // Waste Manag. 2013. V. 33. P. 1616–1625.
- Rihani M., Malamis D., Bihaoui B., Etahiri S., Loizidou M., Assobhei O. In-vessel treatment of urban primary sludge by aerobic composting // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. P. 5988–5995.
- Rincón C.A., De Guardia A., Couvert A., Soutrel I., Guezal S., Le Serrec C. Odor generation patterns during different operational composting stages of anaerobically digested sewage sludge // Waste Manag. 2019. V. 95. P. 661–673.
- Sánchez Ó.J., Ospina D.A., Montoya S. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process // Waste Manag. 2017. V. 69. P. 136–153.
- Sasaki H., Maruyama G., Suzuki H., Nonaka J., Sato M., Sasaki T., Ohta M., Nakai Y. Distribution of ammonia assimilating bacteria in the composting process Compost // Sci. Util. 2004. V. 12. P. 108–113.
- Seldin L., Rosado A.S., Da Cruz D.W., Nobrega A., van Elsas G.D. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizosphere, rhizosphere and non-root-associated soil

- from maize planted in two different Brazilian soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 3860–3868.
- Vázquez M.A., de la Varga D., Plana R., Soto M. Nitrogen losses and chemical parameters during co-composting of solid wastes and liquid pig manure // *Environ. Technol.* 2018. V. 39. P. 2017–2029.
- Wang K., Li W., Li X., Ren N. Spatial nitrifications of microbial processes during composting of swine, cow and chicken manure // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. Article 14932.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 5261–5267.
- Weglarz T.C., Holsen L.K., Ribbons R.R., Hall D.J. Microbial diversity and nitrogen-metabolizing gene abundance in backyard food waste composting systems // *J. Appl. Microbiol.* 2018. V. 125. P. 1066–1075.
- Yang H.-X., Wang X., Liu X.-W., Zhang J., Yang G.-Q., Lau K.W.K., Li S.-P., Jiang J.-D. *Fluviicola hefeinensis* sp. nov., isolated from the wastewater of a chemical factory // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 700–704.
- Zeng Y., De Guardia A., Ziebal C., De Macedo F.J., Dabert P. Impact of biodegradation of organic matters on ammonia oxidation in compost // *Bioresour. Technol.* 2013. V. 136. P. 49–57.
- Zhang L.L., Zhang H.Q., Wang Z.H., Chen G.J., Wang L.S. Dynamic changes of the dominant functioning microbial community in the compost of a 90 m³ aerobic solid state fermentor revealed by integrated meta-omics // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 203. P. 1–10.
- Zorpas A.A., Loizidou M. Sawdust and natural zeolite as a bulking agent for improving quality of a composting product from anaerobically stabilized sewage sludge // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. P. 7545–7552.

Dynamics of Biological Processes during Composting of Anaerobically Digested Wastewater Sludge

V. V. Mironov¹*, E. A. Bochkova¹, A. V. Gannesen¹, A. V. Vanteeva¹,
Yu. I. Russkova¹, and A. N. Nozhevnikova¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: 7390530@gmail.com

Received February 26, 2020; revised March 13, 2020; accepted March 27, 2020

Abstract—Microbiological processes occurring in the course of controlled thermophilic composting of dehydrated wastewater sludge anaerobically digested in a reactor at the Lyubertsy waste treatment plant (Moscow, Russia) were studied. Dynamics of the concentrations of nitrogen species in the presence of microorganisms of the nitrogen cycle (ammonifying, nitrifying, denitrifying, and nitrogen-fixing) was studied at the changed temperature modes at sequential stages of long-term composting (98 days). During the active stage of composting, considerable emission of ammonia (553–861 mg m⁻³) and nitrogen oxide (67–86 mg m⁻³) were observed on days 6–10; these values significantly exceeded the accepted allowances for atmospheric emissions. Abundance of culturable heterotrophic microorganisms, CFU numbers of nitrogen-fixers, and the presence and activity of cultured nitrifying and denitrifying microorganisms were determined using microbiological techniques. The data of real-time PCR and NGS profiling by the 16S rRNA genes were used to analyze the taxonomic diversity of the microorganisms involved in composting (bacteria, archaea, and fungi); the patterns of succession within the microbial community during this process were established. Laboratory experiments revealed the potential for further decomposition of organic matter of digested sludge, which was probably unavailable to microorganisms under anoxic conditions, but could be degraded by the aerobic microbiota, resulting in a product stimulating plant growth and containing 2.3% of total nitrogen and containing ammonium and nitrate nitrogen (890 and 3750 mg kg⁻¹, respectively).

Keywords: composting, dehydrated anaerobically digested wastewater sludge, ammonification, nitrification, heterotrophic aerobic microorganisms, PCR