

ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ АМАРАНТА БАГРЯНОГО (*Amaranthus cruentus* L.) ДЛЯ УСИЛЕНИЯ МЕТАНОГЕНЕЗА ПРИ БИОКОНВЕРСИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ*

С.Т. МИНЗАНОВА¹, В.Ф. МИРОНОВ¹, Д.Е. БЕЛОСТОЦКИЙ¹,
А.З. МИНДУБАЕВ¹, Л.Г. МИРОНОВА¹, М.С. ГИНС², В.К. ГИНС²,
П.Ф. КОНОНКОВ², В.А. МИЛЮКОВ¹

Метановое брожение, или биометаногенез — образование смеси, состоящей приблизительно из 65 % CH₄, 30 % CO₂, 1 % H₂S и незначительных количеств N₂, O₂, H₂ и CO, осуществляется в анаэробных условиях многокомпонентным микробным консорциумом. Его особенность заключается в способности конвертировать в биогаз практически все классы органических соединений, бытовые, сельскохозяйственные и некоторые промышленные отходы. Нами впервые проведена оценка влияния добавок на основе амаранта багряного (*Amaranthus cruentus* L.) на эффективность процесса получения биогаза из органических отходов. Установлено, что оптимизация субстрата по органическому веществу с использованием фитомассы или жома амаранта, полученного после извлечения всех практически ценных веществ, позволяет производить биогаз из осадков сточных вод, решая экологическую проблему обеззараживания и утилизации отходов, а также энергетическую задачу получения дешевого возобновляемого источника топлива. Амарант багряный — высокоурожайная культура, для которой характерно высокое содержание белка. Его биомасса служит промышленно воспроизводимым растительным сырьем. В результате цикла исследований по разработке оригинальных способов получения рутина, растительного белка, пектина на основе *A. cruentus* нами предложена схема комплексной переработки, включающей экстрактивное извлечение указанных веществ из высушенной фитомассы растения в едином технологическом цикле. Жом амаранта после извлечения всех ценных соединений был предложен в качестве косубстрата для анаэробного сбраживания органических отходов. Влияние добавок амаранта на получение биогаза моделировали в лабораторных условиях, используя в качестве субстрата крупнотоннажный осадок сточных вод (ОСВ) с городских очистных сооружений. Выявлена зависимость эффекта от количества добавки (избыток фитомассы амаранта 74 % и 87 % подавлял метаногенез). Изучение сбраживания ОСВ после фильтр-пресса (влажность 45 %) в мезофильном (37 °С) и термофильном (50 °С) режимах с добавлением жома амаранта показало преимущество термофильного режима (удельный выход биогаза составил 354 мл/г сухого вещества). Кроме того, в присутствии амарантового жома продуктивность биометаногенеза в мезофильном режиме тоже повышалась на 87,0 %, при этом практически отсутствовала лаг-фаза, содержание CH₄ в течение всего эксперимента составляло около 60 %, а удельный выход биогаза достигал 251,9 мл/г сухого вещества, или ~ 0,25 м³ биогаза из 1 кг сухого вещества органического сырья. С целью поиска активной фракции фитомассы амаранта провели серию экспериментов с экстрактами амаранта при использовании растворителей различной полярности — дихлорметана, 70 % водного этанола и дистиллированной воды. Установлено, что в случае экстрактов CH₂Cl₂ и EtOH лаг-фаза сокращалась до 10 сут, что сопоставимо с действием фитомассы амаранта. Очевидно, в этих экстрактах содержатся компоненты, которые либо подвергаются быстрой деструкции под влиянием сообщества микроорганизмов, превращаясь в биогаз, либо способствуют росту бактерий. При добавлении дихлорметанового экстракта к субстрату происходило наиболее эффективное выделение биогаза, что согласуется с данными литературы. Полученные результаты указывают на экологическую и экономическую целесообразность использования жома амаранта при утилизации органических отходов.

Ключевые слова: *Amaranthus cruentus* L., амарант, метаногенез, косубстрат, экстракт фитомассы амаранта, биогаз, осадок сточных вод, жом амаранта.

Метановое брожение, или биометаногенез, — известный процесс превращения биомассы в энергию (1). Образование биогаза (смесь, состоящая приблизительно из 65 % CH₄, 30 % CO₂, 1 % H₂S и незначительных количеств N₂, O₂, H₂, CO) осуществляется в анаэробных условиях многокомпонентным микробным консорциумом, особенность которого заключается в способности конвертировать в биогаз практически все классы органических соединений, бытовые, сельскохозяйственные и некоторые

* Работа выполнена при финансовой поддержке программы № 3 Президиума РАН и гранта РФФИ № 14-08-31768.

промышленные отходы (2). Метаногенез осуществляют крайне специализированные прокариоты — очень древние археобактерии, или археи, родов *Methanobacterium*, *Methanosaeta* (*Methanothrix*), *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanocorpusculum*, *Methanobrevibacteria* и *Methanopyrus* (3-6).

Анализ состояния работ по получению биогаза (7-10) показывает, что задача интенсификации метанового сбраживания органического сырья сохраняет актуальность. Одно из перспективных направлений — поиск растительных стимуляторов и ингибиторов метаногенеза. Так, было выполнено сравнение состава летучих жирных кислот (ЛЖК) и выхода биогаза под влиянием 13 растительных экстрактов, выбранных по наивысшей флавоноидной активности (11) (сбраживали смесь экстракта из травяной фитомассы и ячменного зерна в соотношении 50:50). Эксперименты показали, что экстракты из *Lavandula officinalis* и *Solidago virgaurea* стимулируют брожения, а из *Equisetum arvense* и *Salvia officinalis* — ингибируют выработку метана. Вызывает интерес работа, посвященная изучению действия экстрактов травянистых растений (21 вид) на метаногенез, на грамположительные и грамотрицательные бактерии, их антимикробный потенциал, а также деструкцию сухого вещества *in vitro* (12). Экстракты получали с помощью метанола, ацетона или воды и определяли содержание в них общих сахаров, танинов и сапонинов. Антимикробный потенциал оценивали на грамположительных стрептококках и стафилококках и грамотрицательных бактериях *Esherichia coli* и *Enterobacter*. Ацетоновый и метанольный экстракты из *Eucalyptus globulus* и водный экстракт из *Sapindus mukorossi* и *E. globulus* ингибировали метаногенез *in vitro*. При изучении влияния богатых сапонидами экстрактов из листьев *Carduus*, *Sesbania* и *Knautia*, а также из семян пажитника сеного (*Trigonella foenum-graecum*) на брожение в рубце, выделение метана и микробное сообщество (13) показано, что сапонины, обладая антипротозойной активностью, не угнетают метаногенез. Сапонины семян пажитника повышают активность содержимого рубца и влияют на микробное сообщество, усиливая рост бактерий, расщепляющих волокна, и подавляя рост популяции грибов.

Для повышения производительности метантенков также широко практикуется добавление в осадок очистных сооружений различной растительной биомассы (14). Добавление косубстратов, например навоза, позволяет обогатить бедный по углероду субстрат органическим веществом. Более 50 % получаемого биогаза в Европе основано на использовании растений (15, 16). Поиск косубстратов для эффективной биоконверсии органических отходов сельского хозяйства и городских стоков в биогаз с высоким содержанием метана остается актуальной задачей.

Нами впервые в качестве косубстратов изучены фитомасса и жом культурного амаранта, полученный после извлечения всех практически ценных веществ, и определено его оптимальное соотношение с субстратом (осадок городских сточных вод), усиливающее образование биогаза и метановое брожение.

Целью работы была оценка влияния добавок на основе амаранта багряного на эффективность конверсии осадочного ила очистных сооружений и органических отходов в биогаз с высоким содержанием метана.

Методика. В качестве субстрата использовали осадок сточных вод (ОСВ, влажность 80,4 %; уплотненный ОСВ, влажность 98,4 %; ОСВ после фильтр-пресса, влажность 45,0 %) г. Казани, косубстрата — фитомассу, жом, образующийся после комплексной переработки (выделения пектинов, рутина и растительного белка), и экстракты (спиртовой, дихлорметановый и водный) жома амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка. В суб-

страте и косубстрате определяли элементный состав (С, Н, N и S) на анализаторе СНН-3 (ОКБА НПО «Химавтоматика», Россия); стандартом служил стрептоцид (С — 41,85 %, Н — 4,65 %, N — 16,26 %, S — 18,58 %).

В экспериментах варьировали вид субстрата, вид косубстрата, соотношение субстрата и косубстрата, температуру инкубации. Ферментацию проводили в лабораторных реакторах, состоящих из водяной бани LB-160 и погружного термостата-циркулятора LT-100 (бутыли из стекла МТО БКЗ-50, V = 500 мл) («ЛОИР», Россия).

При сравнении метанообразования в зависимости от доли косубстрата в смеси с ОСВ (24, 52, 74 и 87 % по абсолютно-сухой массе, рассчитанной с учетом влажности ОСВ и косубстрата) использовали высушенную фитомассу амаранта; ко всем образцам добавляли 100,5 г уплотненного ОСВ, ферментацию проводили при 37 °С. Воздействие мезофильного (37 °С) и термофильного (50 °С) режимов инкубации исследовали при сбраживании ОСВ после фильтр-пресса (количество субстрата — 50,0 г с добавлением 100 мл дистиллированной воды). В том же опыте изучили влияние амарантового жома как косубстрата на эффективность мезофильной (37 °С) ферментации (количество субстрата — 22,5 г, жома с влажностью 9,2 % — 16,7 г; 100 мл дистиллированной воды). При определении эффекта экстрактов жома к субстрату (смесь 37,5 г ОСВ и 105,0 г уплотненного ОСВ) добавляли 0,2 г дихлорметанового (CH₂Cl₂), 0,2 г спиртового (EtOH) или 2,3 г водного экстракта амаранта (экстракты были получены упариванием досуха в ротационном испарителе ИР-1ЛТ, Россия); для сравнения экстракты заменяли жомом амаранта (5,0 г) (инкубация при 37 °С).

Объем выделяемого биогаза определяли ежесуточно волюмометрически (17). Содержание метана в пробах контролировали методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) (CHROM-5, «Laboratorní přístroje», Чехия, колонка 2,4 м с наполнителем Porapak Q, 80-100 меш, «Sigma-Aldrich Co.», США; 80 °С; детектор по теплопроводности, газ-носитель гелий).

Изменение состава микроорганизмов в процессе сбраживания ОСВ выявляли при культивировании на средах для метаногенов (18) и окрашивании по Граму с микрокопированием (МБИ-15, АО «ЛОМО», Россия).

Данные обрабатывали в программе Origin 6.1 (https://softadvice.informer.com/Origin_6.1_Free_Download.html). В таблицах и на рисунках приведены средние (M) и стандартные ошибки средних (\pm SEM). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при p = 0,05.

Результаты. Выбор амаранта *Amaranthus cruentus* обусловлен тем, что у этой культуры, имеющей высокую урожайность, биомасса с высоким содержанием белка (19-21) служит промышленно воспроизводимым растительным сырьем. Нами в цикле исследований разработаны оригинальные способы и схема получения рутина, растительного белка и пектина при комплексной переработке амаранта (20) на основе экстрактивного извлечения из высушенной фитомассы в едином технологическом цикле.

1. Элементный состав осадка сточных вод (ОСВ), фитомассы и жома амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка, использованных при лабораторном моделировании производства биогаза

Субстрат, косубстрат	С, %	Н, %	N, %	C/N
Уплотненный ОСВ	34,65	6,20	7,15	4,9
ОСВ	39,82	7,05	5,81	6,9
Фитомасса амаранта	36,98	4,67	3,47	10,7
Жом амаранта	42,11	6,42	5,20	8,1

Характеристика использованных в эксперименте субстратов и ко-

субстратов приведена в таблицах 1 и 2. Процесс метаногенеза моделировали в лабораторных условиях, используя биореактор (рис. 1).

2. Характеристика субстратов с разным содержанием высушенной фитомассы амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка, использованных при лабораторном моделировании производства биогаза ($n = 3, M \pm SEM$)

Доля амаранта, %	Сухое вещество, г	Органическое сухое вещество, г	Влажность, %
24	11,2±0,34	7,3±0,22	92,1±2,76
52	15,9±0,48	11,3±0,34	89,0±2,67
74	18,1±0,54	13,7±0,41	86,7±2,60
87	21,5±0,65	16,9±0,51	83,2±2,50

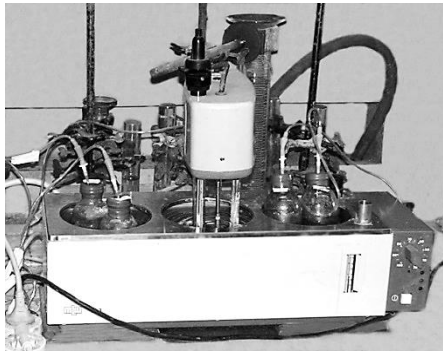


Рис. 1. Лабораторная установка для получения биогаза ($V = 500$ мл, «ЛОИР», Россия).

Кинетика выделения CH_4 при добавлении 24, 52, 74 и 87 % сухой фитомассы амаранта в качестве косубстрата (рис. 2) свидетельствовала о наибольшем повышении выхода биогаза в варианте с 24 % (291,1 мл/г сухого вещества, достоверно при $p = 0,05$). Эффект сохранялся в течение 50 сут (табл. 3), содержание CH_4 в биогазе составляло при этом около 60 % (см. рис. 2). Более объективным критерием эффективности процесса служит удельный выход биогаза при пересчете на содержание органического сухого вещества в субстрате, который также оказался высоким (см. табл. 3).

который также оказался высоким (см. табл. 3).

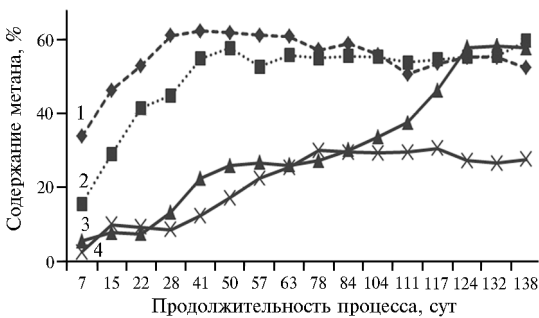


Рис. 2. Кинетика выделения CH_4 при биоконверсии осадка городских сточных вод в зависимости от содержания сухой фитомассы амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка в субстрате: 1 — 24 %, 2 — 52 %, 3 — 74 %, 4 — 87 % (среднее для 3 повторностей, лабораторный опыт).

этом составляло примерно 55 % (см. рис. 2).

Добавление 52 % амаранта приводило к выходу биогаза 226,6 мл/г сухого вещества (достоверно при $p = 0,05$). Выделение биогаза происходило в течение 138 сут, а содержание метана при этом составляло примерно 55 % (см. рис. 2).

3. Продукция биогаза при биоконверсии осадка городских сточных вод в зависимости от содержания сухой фитомассы амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка в субстрате ($n = 3, M \pm SEM$, достоверно при уровне значимости 5 %, лабораторный опыт)

Доля амаранта, %	Удельный выход		
	мл газа/мл субстрата	мл газа/г сухого вещества	мл газа/г органического сухого вещества
24	23,0±1,15 ^a	291,1±14,60	445,1±22,26
52	24,9±1,25 ^a	226,6±11,33	318,5±15,93
74	17,0±0,85	127,8±6,39	168,4±8,42
87	4,7±0,24	29,1±1,46	36,9±1,85

Примечание. Между вариантами, помеченными буквой (a), отсутствуют статистически значимые различия при $p = 0,05$.

При содержании фитомассы амаранта 74 % процесс имел длительную лаг-фазу — активация газообразования происходила только после

110-х сут. Избыток амаранта угнетал метаногенез: удельный выход биогаза составлял 127,8 мл/г сухого вещества (см. табл. 3). При 87 % амаранта содержание метана в биогазе не превышало 30 % (см. рис. 2) при выходе биогаза 29,1 мл/г сухого вещества (достоверно при $p = 0,05$, см. табл. 3). Соотнесение этих результатов с данными, представленными в таблице 2, показывает, что оптимальная влажность субстрата для метаногенеза — не менее 90 %, и с ее уменьшением газообразование снижалось. Следовательно, добавление фитомассы амаранта к субстрату было эффективно только при определенном количественном соотношении с ОСВ, тогда как при избытке фитомассы амаранта метаногенез подавлялся.

Динамику изменения pH ОСВ при добавлении фитомассы амаранта (52 %) иллюстрирует рисунок 3.

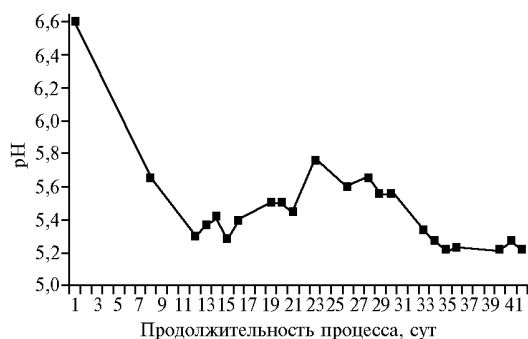


Рис. 3. Повышение кислотности среды при анаэробном сбраживании осадка городских сточных вод с добавлением 52 % сухой фитомассы амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка (среднее для 3 повторностей, лабораторный опыт).

При использовании в качестве косубстрата жома амаранта, образующегося после комплексной переработки и извлечения пектинов, рутина и растительного белка (22, 23), лаг-фаза

в мезофильном режиме занимала 30 сут. При достижении максимального суточного выхода биогаза (около 120 мл на 40-е сут) в нем отмечали высокое (60 %) содержание CH_4 (рис. 4). Удельная продуктивность в эксперименте составила 134,7 мл/г сухого вещества (достоверно при $p = 0,05$, табл. 4). В термофильном режиме объем выделяемого биогаза значительно увеличивался: более 20 сут его выход превышал 200 мл. Кроме того, лаг-фаза процесса сокращалась до 14 сут при содержании CH_4 в биогазе более 50 % (см. рис. 4).

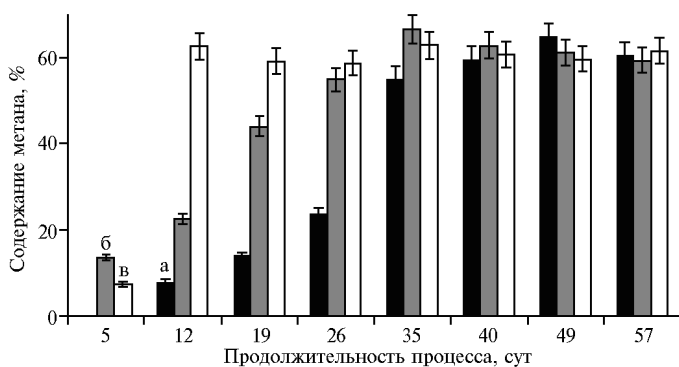


Рис. 4. Содержание CH_4 в биогазе при разных температурных режимах анаэробного сбраживания осадка городских сточных вод (ОСВ) в присутствии жома амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка: а — ОСВ, мезофильный режим (37 °C), б — ОСВ, термофильный режим (50 °C), в — ОСВ, жом, мезофильный режим ($n = 3$, $p = 0,05$, лабораторный опыт).

Удельный выход биогаза составлял 354,0 мл/г сухого вещества (достоверно при $p = 0,05$), что указывает на преимущество термофильного режима сбраживания ОСВ без добавления амаранта. При добавлении амарантового жома в субстрат выход биогаза в мезофильном режиме повышался (лаг-фаза практически отсутствовала, на 12-е сут количество биогаза достигало 80 мл при содержании CH_4 62 %) (см. рис. 4). Только после 60-х сут выход газа уменьшался до 20 мл при содержании CH_4 около 60 % до завершения эксперимента. Удельный выход биогаза при

добавлении амарантового жома в мезофильном режиме соответствовал $\sim 0,25 \text{ м}^3$ на 1 кг сухого вещества органического сырья.

4. Продукция биогаза при био конверсии осадка городских сточных вод (ОСВ) в зависимости от температурного режима и содержания жома амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка в субстрате ($n = 3$, $M \pm \text{SEM}$, достоверно при уровне значимости 5 %, лабораторный опыт)

Состав среды	Режим	Удельный выход	
		(мл газа/мл субстрата)	(мл газа/г сухого вещества)
ОСВ	Мезофильный, 37 °С	20,5±1,03 ^a	134,7±6,74
ОСВ + жом амаранта	Мезофильный, 37 °С	22,7±1,14 ^a	251,9±12,60
ОСВ	Термофильный, 50 °С	53,1±2,66	354,0±17,70

Пр и м е ч а н и е. Между вариантами, помеченными буквой (^a), отсутствуют статистически значимые различия при $p = 0,05$.

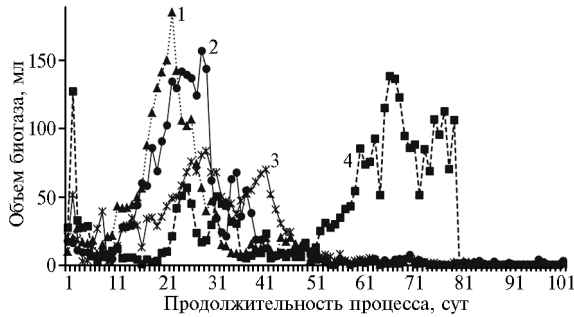


Рис. 5. Кинетика выделения биогаза при био конверсии осадка городских сточных вод с добавлением спиртового (1), дихлорметанового (2) и водного (3) экстрактов и жома амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка (4) (среднее для 3 повторностей, лабораторный опыт).

Дихлорметановый экстракт фитомассы амаранта (22) имеет зеленый цвет благодаря присутствию хлорофилла, водный экстракт содержит углеводы, белки, минеральные соли и амарантин, а этанольный богат фенольными соединениями — рутином и кверцетином. Жом после трех экстракций содержал клетчатку, белок, углеводы и пектины (22). Наблюдаемая кинетика газообразования при мезофильном сбраживании смеси ОСВ и уплотненного ОСВ (рис. 5) подтвердила, что при добавлении экстрактов CH_2Cl_2 и EtOH к субстрату лаг-фаза сокращалась до 10 сут. Это сопоставимо с действием фитомассы амаранта. Очевидно, в дихлорметановом и этанольном экстрактах содержатся компоненты, которые либо подвергаются быстрой деструкции под влиянием сообщества микроорганизмов, превращаясь в биогаз, либо способствуют росту биомассы. При добавлении CH_2Cl_2 -экстракта к субстрату наблюдалось наиболее эффективное выделение биогаза, что согласуется с данными литературы (11, 24-27) (табл. 5).

5. Продукция биогаза при био конверсии осадка городских сточных вод с добавлением разных экстрактов и жома амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) сорта Дюймовочка ($n = 3$, $M \pm \text{SEM}$, достоверно при уровне значимости 5 %, лабораторный опыт)

Косубстрат	Удельный выход		
	мл газа/мл субстрата	мл газа/г сухого вещества	мл газа/г органического сухого вещества
Экстракт CH_2Cl_2	16,2±0,81 ^a	266,1±13,31 ^b	433,5±21,68
Экстракт EtOH	14,5±0,73 ^a	236,1±11,81 ^{c, d}	382,5±19,13 ^e
Водный экстракт	16,6±0,83 ^a	221,8±11,09 ^c	345,8±17,29 ^e
Жом амаранта	23,7±1,19	259,1±12,96 ^{b, d}	355,4±17,77 ^e

Пр и м е ч а н и е. Между вариантами, помеченными одинаковыми буквами, отсутствуют статистически значимые различия при $p = 0,05$.

При добавлении жома удельный выход биогаза составил 259,1 мл/г сухого вещества (достоверно при $p = 0,05$), что сопоставимо с аналогичным показателем (266,1 мл/г сухого вещества) для экстракта, полученного с использованием CH_2Cl_2 , при содержании CH_4 на 98-е сут 82,5 % (максимум).

симальное значение за весь период исследований. Отметим, что жом амаранта после трех экстракций (см. табл. 5), как и фитомасса амаранта (см. табл. 3), служит активирующим косубстратом метаногенеза (Патент РФ № 2351552). Таким образом, в присутствии амарантового жома продуктивность биометаногенеза в мезофильном режиме тоже возросла (на 12,8 %, достоверно при $p = 0,05$), что в целом повышает эффективность комплексной переработки сырья, получаемого при выращивании этой культуры. Представленные результаты указывают на экологическую и экономическую целесообразность использования жома амаранта.

Микробиологическое изучение образцов при анаэробном сбраживании ОСВ показало, что для исходного субстрата характерно присутствие крупных эукариотических форм. В период максимальной активности газообразования (40-е сут) в среде преобладали грамположительные мелкие палочковидные бактерии — как одиночные, так и собранные в длинные цепочки. Очень мелкие одиночные формы были более типичны для питательной среды на основе ацетата. На МПА (18) наблюдали образование гладких и шероховатых колоний. На среде для метаногенов выросло значительное количество очень мелких колоний. Встречались как грамположительные, так и грамотрицательные формы.

Итак, наши исследования показали, что оптимизация субстрата по органическому веществу с использованием фитомассы или жома амаранта позволяет производить биогаз из осадков сточных вод с более высокой эффективностью, решая задачу утилизации отходов и получения топлива из дешевого возобновляемого источника.

¹*Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова — обособленное структурное подразделение ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», 420088 Россия, г. Казань, ул. Арбузова, 8, e-mail: minzanova@iopc.ru ✉; mironov@iopc.ru, DimBoss@yandex.ru, mindubaev-az@yandex.ru, mironoval1963@gmail.com, miluykov@iopc.ru; ФГБНУ Федеральный научный центр овощеводства, 143080 Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14, e-mail: anirr@bk.ru, anirr67@yandex.ru*

Поступила в редакцию 6 января 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 1, pp. 209-217

MATERIALS DERIVED FROM *Amaranthus cruentus* L. USED AS CO-SUBSTRATES CAN INTENSIFY METHANOGENESIS DURING BIOCONVERSION OF ORGANIC WASTE

S.T. Minzanova¹, V.F. Mironov¹, D.E. Belostotskii¹, A.Z. Mindubaev¹, L.G. Mironova¹, M.S. Gins², V.K. Gins², P.F. Kononkov², V.A. Milyukov¹

¹*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Subdivision of Federal Kazan Scientific Center RAS, Federal Agency for Scientific Organizations, 8, ul. Arbuzova, Kazan, 420088 Russia, e-mail minzanova@iopc.ru (✉ corresponding author), mironov@iopc.ru, DimBoss@yandex.ru, mindubaev-az@yandex.ru, mironoval1963@gmail.com, miluykov@iopc.ru;*

²*Federal Research Center for Vegetable Growing, Federal Agency for Scientific Organizations, 14, ul. Selektionnaya, pos. VNISSOK, Odintsovskii Region, Moscow Province, 143080 Russia, e-mail anirr@bk.ru, anirr67@yandex.ru*

Minzanova S.T. orcid.org/0000-0001-9678-8821
Mironov V.F. orcid.org/0000-0002-4198-3774
Belostotskii D.E. orcid.org/0000-0002-2824-1223
Mindubaev A.Z. orcid.org/0000-0002-8596-7805
Mironova L.G. orcid.org/0000-0003-1919-571X

Gins M.S. orcid.org/0000-0001-5995-2696
Gins V.K. orcid.org/0000-0002-7053-4345
Kononkov P.F. orcid.org/0000-0001-7101-3528
Milyukov V.A. orcid.org/0000-0002-8069-457X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the RAS Presidium Program № 3 and Russian Foundation for Basic Research (grant

Abstract

Methane fermentation (biomethanogenesis) performed by a multicomponent microbial consortium under anaerobic conditions results in a mixture of approximately 65 % CH₄, 30 % CO₂, 1 % H₂S and minor amounts of N₂, O₂, H₂ and CO. The peculiarity of biomethanogenesis lies in the ability to convert almost all classes of organic compounds, household, agricultural and some industrial waste into biogas. We were the first to assess the efficiency of the biogas production from organic waste as influenced by various materials derived from amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) which were used as co-substrates. Our findings indicate that optimization of the substrate organic matter composition by using dry phytomass of amaranth plants or amaranth pulp which remains after removing all practically valuable substances makes it possible to produce biogas from sewage sludge. This facilitates solving ecological problems of waste disinfection and utilization, and gives us an alternative, cheap and renewable source for fuel. Cultivated *A. cruentus* is a high-yielding protein-rich crop. Its biomass serves as a reproducible raw material. In our previous works, we reported the technology for rutin, vegetable protein and pectin production from *A. cruentus* plants, and suggested a scheme for complex processing which includes extraction of these substances from amaranth dry phytomass in a single technological cycle. The pulp obtained after extraction of all valuable compounds was proposed as a co-substrate for organic waste anaerobic fermentation. We modeled the effect of amaranth-derived substances on biogas production in the laboratory bioreactor using large-tonnage urban sewage sludge as a substrate. It was shown that the doses of the additives affected the process, i.e. the excess of amaranth plant mass (74 % and 87 %) suppressed methanogenesis. The thermophilic (50 °C) fermentation was found to be superior to the mesophilic one (37 °C), with the biogas production of 354 ml per gram of dry matter, when large-tonnage sewage sludge after filter press (45 % humidity) was fermented using amaranth pulp as the co-substrate. Moreover, in the presence of amaranth pulp, the biomethanogenesis under the mesophilic conditions also increased, the lag phase was almost absent, and the CH₄ level throughout the experiment was about 60 %. As a result, the specific biogas yield reached 251.9 ml per gram of dry matter that is equivalent to ~ 0.25 m³ of the resultant biogas from 1 kg of organic raw material dry matter. In order to search for the active fraction of amaranth phytomass, we used solvents of different polarity, i.e. dichloromethane, 70 % aqueous ethanol and distilled water. It was found that the lag phase reduced to 10 days with the CH₂Cl₂ and EtOH extracts, which was comparable to that in the presence of dry amaranth phytomass. Obviously, these extracts contain components which either undergo rapid destruction by microorganisms able to turn them into biogas, or contribute to bacterial growth. The dichloromethane extract added to the substrate led to the most efficient biogas production, which is consistent with the literature data. Our findings indicate the ecological and economic feasibility of using amaranth pulp for organic waste bioconversion.

Keywords: *Amaranthus cruentus* L., amaranth, methanogenesis, co-substrate, amaranth phytomass extracts, biogas, sewage sludge, amaranth pulp.

REFERENCES

1. Varfolomeev S.D., Efremenko E.N., Krylova L.P. *Uspekhi khimii*, 2010, 79(6): 544-564 (in Russ.).
2. Varfolomeev S.D., Moiseev I.I., Myasoedov B.F. *Vestnik Rossiiskoi akademii nauk*, 2009, 79(7): 595-604 (in Russ.).
3. Gerardi M.H. *The microbiology of anaerobic digesters*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.
4. Schiraldi C., Giuliano M., de Rosa M. Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea*, 2002, 1(2): 75-86 (doi: 10.1155/2002/436561).
5. Vogt C., Kleinstaub S., Richnow H.-H. Anaerobic benzene degradation by bacteria. *Microbial Biotechnol.*, 2011, 4(6): 710-724 (doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00260.x).
6. Fowler S.J., Dong X., Sensen C.W., Sufliya J.M., Gieg L.M. Methanogenic toluene metabolism: community structure and intermediates. *Environ. Microbiol.*, 2012, 14(3): 754-764 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02631.x).
7. Ahring B.K., Ellegaard L., Angelidaki I., Schmidt J.E., Gavala H.N., Skiadas I.V., Ahring B.K., Haagensen F., Dolfing J., Mogensen A.S., Lyberatos G., Stamatielatos K., Pind P.F. *Bio-methanation II*. B.K. Ahring (ed.). Springer, Berlin, 2003 (doi: 10.1007/3-540-45838-7).
8. Doublein D., Steinhäuser A. *Biogas from waste and renewable resources*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008 (doi: 10.1002/9783527632794).
9. Samer M. Biogas plant constructions. In: *Biogas*. S. Kumar (ed.). InTech, Rijeka, Croatia, 2012: 343-368.
10. Pisarikova B., Peterka J., Trackova M., Moudry J., Zraly Z., Herzig I. Chemical composition of the above-ground biomass of *Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*. *Acta Vet. BRNO*,

- 2006, 75(1): 133-138.
11. Broudiscou L.P. Papon G., Broudiscou A.F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2000, 87(3-4): 263-277 (doi: 10.1016/S0377-8401(00)00193-0).
 12. Sirohi S.K., Pandey N., Goel N., Singh B., Mohini M., Pandey P., Chaudhry P.P. Microbial activity and ruminal methanogenesis as affected by plant secondary metabolites in different plant extracts. *International Journal of Environmental Science and Engineering*, 2009, 1(1): 52-58.
 13. Goel G., Makkar H.P.S., Becker K. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, 105(3): 770-777 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03818.x).
 14. Mursec B., Vindis P., Janzekovic M., Brus M., Cus F. Analysis of different substrates for processing into biogas. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, 2009, 37(2): 652-659.
 15. Karpenstein-Machan M. *Energiepflanzenbau für Biogasanlagenbetreiber*. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, 2005.
 16. Ferry J.G., Kastead K.A. Methanogenesis. In: *Archaea: molecular and cellular biology*. R. Cavicchioli (ed.). ASM Press, Washington, 2007, Ch. 13: 288-314.
 17. Guben-Veil' N.N. *Metody organicheskoi khimii* [Methods of organic chemistry]. Moscow, 1963 (in Russ.).
 18. Netrusov A.I., Kotova I.B. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Moscow, 2006 (in Russ.).
 19. Minzanova S.T., Mironov V.F., Konovalov A.I., Vyshtakalyuk A.B., Tsepaeva O.V., Mindubaev A.Z., Mironova L.G., Zobov V.V. *Pektiny iz netraditsionnykh istochnikov: tekhnologiya, struktura, svoystva i biologicheskaya aktivnost'* [Pectins from non-traditional sources: technology, structure, properties and biological activity]. Kazan', 2011 (in Russ.).
 20. Gins V.K., Kononkov P.F., Pivovarov V.F., Gins M.S. [Creation of varieties and hybrids of vegetable crops with increased content of biologically active substances and antioxidants]. *Agricultural Biology*, 2003, 1: 108-113 (in Russ.).
 21. Vysochina G.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2013, 2: 5-14 (in Russ.).
 22. Minzanova S.T., Mironov V.F., Vyshtakalyuk A.B., Tsepaeva O.V., Mironova L.G., Konovalov A.I. *Izvestiya AN. Ser. khim.*, 2014, 9: 2142-2155 (in Russ.).
 23. Mindubaev A.Z., Minzanova S.T., Skvortsov E.V., Mironov V.F., Zobov V.V., Akhmadullina F.Yu., Mironova L.G., Belostotskii D.E., Konovalov A.I. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2009, 4: 220-226 (in Russ.).
 24. Oh S., Shintani R., Koike S., Kobayashi Y. Ginkgo fruit extract as an additive to modify rumen microbiota and fermentation and to mitigate methane production. *J. Dairy Sci.*, 2017, 100(3): 1923-1934 (doi: 10.3168/jds.2016-11928).
 25. Perna F.F. Jr., Cassiano_E.C.O., Martins_M.F., Romero_L.A., Zapata_D.C.V., Pinedo_L.A., Marino_C.T., Rodrigues P.H.M. Effect of tannins-rich extract from *Acacia meamsii* or monensin as feed additives on ruminal fermentation efficiency in cattle. *Livest. Sci.*, 2017, 203: 21-29 (doi: 10.1016/j.livsci.2017.06.009).
 26. Medjekal S., Bodas R., Bousseboua H., Lypez S. Evaluation of three medicinal plants for methane production potential, fiber digestion and rumen fermentation in vitro. *Energy Procedia*, 2017, 119: 632-641 (doi: 10.1016/j.egypro.2017.07.089).
 27. Bodas R., Prieto N., Garcia-González R., Andrés S., Lypez S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 2012, 176(1-4): 78-93 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010).