МИКРОБИОЛОГИЯ, 2017, том 86, № 6, с. 729–738

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АНАЭРОБНЫЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, РАЗЛАГАЮЩИЕ БИОМАССУ *ANABAENA VARIABILIS*

© 2017 г. Е. В. Петрова[a], М. А. Егорова[a], Н. Ф. Пискункова[a], П. А. Кожевин[b], А. И. Нетрусов[a], Е. А. Цавкелова[a, *]

[a] *Кафедра микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия*

[b] *Кафедра биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия*

**e-mail: tsavkelova@mail.ru*

Поступила в редакцию 24.05.2017 г.

Четыре метаногенных анаэробных консорциума, выделенные ранее и исходно культивируемые на целлюлозосодержащем субстрате (фильтровальная бумага), были использованы в качестве инокулята для анаэробной биоконверсии биомассы цианобактерий *Anabaena variabilis* в биогаз при 55 °С. Наиболее активные консорциумы образовывали биогаз с содержанием метана до 64%. Однако процесс биотрансформации был эффективен лишь при одноразовом использовании инокулята и предварительной предобработке биомассы цианобактерий (концентрирование и замораживание-оттаивание). При изучении структуры микробных консорциумов вносимых инокулятов методом ДГГЭ в процессе их селекции на фильтровальной бумаге были отмечены качественные изменения в биоразнообразии доминирующих представителей *Bacteria* (соответствующие числу и яркости полос на геле). Состав входящих в эти консорциумы метаногенных *Archaea* оказался сходным и представлен родами *Methanoculleus* и *Methanosarcina*. Обсуждаются эффективность селекции микробных консорциумов и роль микроорганизмов различных трофических групп при биоконверсии таких субстратов, как целлюлоза и биомасса фототрофных микроорганизмов.

Ключевые слова: термофильный микробный консорциум, метаногены, биогаз, биоконверсия, целлюлоза, биомасса фототрофов

DOI: 10.7868/S0026365617060131

Получение топлива альтернативных источников возобновляемого сырья в настоящее время приобретает все больший интерес и одинаково востребовано как в промышленности, так и в децентрализованных системах энергообеспечения. Биогаз, состоящий в основном из метана (55–70%) и углекислого газа (30–45%), характеризуется очень высокой теплотой сгорания в зависимости от содержания метана его теплотворная способность составляет 4700–6000 ккал/м^3 (Ambulkar, Shekdar, 2004; Eze, Uzodinma, 2009). Условиями успешного функционирования биореакторов являются высокое содержание метана в биогазе, скорость его образования и низкая себестоимость процесса. При этом анаэробная биоконверсия органических соединений в биогаз с использованием различных типов органического сырья является сложно контролируемым и неунифицированным процессом, что зачастую связано с недостаточной информацией о биоразнообразии и активности микроорганизмов, входящих в метаногенные микробные консорциумы, а также с отсутствием универсального подхода к разработке биотехнологических систем предобработки сырья, его биотрансформации в биотопливо и последующих этапов его очистки и доставки до потребителя (Цавкелова, Нетрусов, 2012).

Анаэробный метаногенный консорциум имеет сложную структуру, а микроорганизмы, преобразующие органическое вещество в биогаз, таксономически разнообразны и различаются в зависимости от исходных субстратов, условий культивирования и целого ряда абиотических факторов. В многоступенчатом процессе биотрансформации всегда необходимо участие таких основных групп микроорганизмов, как гидролитики, начинающие разложение биополимеров биомассы, синтрофы, участвующие в межвидовом переносе водорода и образующие субстраты метаногенеза (водород, углекислый газ, ацетат), а также метаногены, которые в результате ацетокластического и/или гидрогенотрофного метаногенеза синтезируют основной компонент биогаза – метан (Sieber et al., 2010; Ali Shah et al., 2014). В основном, биогаз получают при разложении органических отходов сельскохозяйственной и животноводческой отраслей, а также получаемых при очистке сточных вод. Некоторое время назад особый ин-

терес вызывала переработка в биотопливо “энергетических” растений, таких как мискантус, сахарный тростник, кукуруза, сорго, подсолнечник, рапс (Antizar-Ladislao, Turrion-Gomez, 2008). Однако на практике иррациональная организация биотехнологий получения биогаза зачастую приводит к большей эмиссии его в атмосферу (Fargione et al., 2008), а обработка пахотных и пастбищных земель под возделывание “энергетических растений” чревата нехваткой плодородной почвы под сельскохозяйственные нужды и может иметь негативное влияние на производство продуктов питания и ценообразование на них (Johanson, Azar, 2007).

В связи с этим, водные фототрофные микроорганизмы рассматривают как альтернативный высшим растениям и перспективный источник органики для получения биотоплива (Debowski et al., 2013; Montingelli et al., 2015). По продуктивности биомассы микроводоросли значительно опережают многие “энергетические растения” (Mata et al., 2010). Однако, несмотря на то что имеются данные об эффективном использовании биомассы одноклеточных фототрофов, например, *Spirulina* sp. (Gassanova et al., 2006), *Chlorella vulgaris* (Ras et al., 2011), *Scenedesmus* spp. (Yen, Brune, 2007) или многоклеточных водорослей, например, *Saccorhiza polyschides, Laminaria digitata*, *Saccharina latissima, Ulva lactuca* (*Bruhn* et al., 2011; Vanegas, Bartlett, 2013; Montingelli et al., 2015) как субстратов для получения биогаза, широкое их применение затруднено за счет ряда факторов. К ним можно отнести трудноразлагаемую клеточную стенку микроводорослей (Nobles et al., 2001), образование токсичных для анаэробных микроорганизмов соединений, в том числе высокое содержание образующегося аммония, повышающего pH среды. Высокое содержание азота в биомассе фототрофов также является причиной низкого соотношения C : N (ниже 10), в то время как оптимальным для метаногенеза являются значения 20 : 1 или 30 : 1 (Marta-Alvarez et al., 2007; Dębowski et al., 2013). Одним из способов преодоления этих затруднений может стать совместное сбраживание водорослевого осадка с добавлением целлюлозосодержащих бумажных отходов (офисная бумага), что, например, позволило почти в 2 раза увеличить скорость образование метана мезофильным (35°C) метаногенным сообществом из аквакультуры с доминирующими видами *Scenedesmus* spp. и *Chlorella* spp. до 1170 мл/л сут (Yen, Brune, 2007).

Ранее мы также показали эффективное использование в качестве субстрата биомассы фототрофных микроорганизмов – цианобактерий *Spirulina platensis* и *Anabaena variabilis* при культивировании мезофильного анаэробного сообщества с образованием 500 и 450 мл биогаза/г сухой биомассы в сутки соответственно (Gasanova et al., 2006). Также нами были выделены несколько активных термофильных микробных консорциумов, образующих биогаз при 55°C при деструкции и разложении различных типов бумажной продукции (фильтровальная и офисная бумаги, картон) (Цавкелова и соавт., 2012а). Культивирование выделенных микробных сообществ в течение полугода позволило выявить наиболее стабильные и высокоактивные из них; селектированные на фильтровальной бумаге в течение нескольких (5) пересевов, наиболее активными оказались консорциумы № 3, 6, 17, 19, 21 и 22, образующие 53.5, 56.3, 54.3, 56.1, 58.4 и 56.6% кумулятивного метана (Цавкелова и соавт., 2012а). В дальнейших исследованиях мы показали, что использование объединенного инокулята из четырех активных консорциумов (№ 6, 17, 19 и 21) способствовало эффективной, без предварительной обработки, биоконверсии в биогаз смеси бумажных отходов, состоящих не только из легкоразлагаемых фильтровальной и офисной бумаг и картона, но и трудноутилизируемых газетной и журнальной бумаг (Прокудина и соавт., 2016).

Целью настоящего исследования было изучить возможность использования выделенных ранее целлюлозолитичеких метаногеннх микробных консорциумов для биотрансформации в биогаз биомассы *Anabaena variabilis.* Одной из задач было определить таксономию образующих метан архей и структуру консорциумов, проявивших наибольшую активность при биотрансформации биомассы цианобактерий в биогаз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Получение накопительных культур и селекция целлюлозолитических метаногенных консорциумов (№ 1–23), отобранных ранее из различных эконишь, включая компостные кучи, донные осадки, иловые отложения водоемов и навоз растительноядных животных, описаны ранее (Цавкелова и соавт., 2012а). Дальнейшее их культивирование проводили в термофильных условиях (55°C) в течение двух–пяти пассажей, как описано ранее (Цавкелова и соавт., 2012а, 2012б) на фильтровальной бумаге (15 г/л). Полученные таким образом целлюлозолитические микробные консорциумы служили инокулятом, которые вносили в количестве 30% (по объему). В качестве субстрата для биоконверсии в биогаз была выбрана пресноводная культура *Anabaena variabilis*, которую выращивали при комнатной температуре в 300 мл безазотистой среды BG-11 (Rippka et al., 1979) и постоянном освещении 600 лк, после чего центрифугировали (6000 *g*, 20 мин) и замораживали при –20°C. После оттаивания биомассу цианобактерий вносили в 30 мл питательной среды (Цавкелова и соавт., 2012а) до концентрации 15 г/л в анаэробные

флаконы, проводили замену воздушной фазы на аргон, флаконы герметично закрывали, добавляли посевной материал. Инокулированные таким образом, микробные консорциумы инкубировали на протяжение 42 сут в темноте при 55°C в термостате ("Binder BD 115", Германия).

Хроматография. Активность микробных консорциумов по биоконверсии биомассы *A. variabilis* в биогаз, определяли по приросту образующегося количества метана. Концентрации CH_4, а также CO_2 и H_2 определяли на газовом хроматографе (Кристалл 2000 М, "Хроматэк", РФ), оснащенном микрокапиллярной колонкой FFIP (15000 × 0.5 мм), газ-носитель – аргон, расход 15 мл/мин, детектор – пламенно-ионизационный (ПИД), температура детектора 200°C, температурный градиент в термостате от 70 до 160°C. Результаты хроматографии обрабатывали с помощью программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (РФ) и рассчитывали согласно ранее описанной методике (Цавкелова и соавт., 2012а, 2012б).

Изучение состава микробных целлюлозолитических консорциумов проводили с помощью методов, позволяющих выявить доминирующие популяции микроорганизмов: DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis; денатурирующий градиентный гель-электрофорез) и SSCP (single-strand-conformation polymorphism; одноцепочечный конформационный полиморфизм) анализа. Для обоих методов использовали ДНК, полученную из биомассы посевного материала, для чего 2 мл инокулята из пятого пассажа, выращенного на фильтровальной бумаге, центрифугировали при 10000*g* 10 мин. Осадок замораживали при –20°C до получения данных хроматографии, после чего проводили экстракцию ДНК из наиболее активных микробных консорциумов. DGGE и SSCP подходы были выбраны поскольку нашей задачей было выявление доминирующих в популяции микроорганизмов, а не анализ всего сообщества в целом.

Выделение ДНК из микробных сообществ проводили фенол-хлороформным методом (Maniatis et al., 1982), очистку – при помощи набора Genomic DNA Purification kit ("Fermentas") в соответствии с протоколом производителя. Геномную ДНК использовали для постановки ПЦР с бактериальными и архейными праймерами. В частности, использовали пару праймеров Univ515F (GTGBCAGCMGCCGCGGTAA) и Bact907R (CCGTCAATTCMTTTGAGTTT) (Muyzer et al., 1998; Kublanov et al., 2009). С полученными ампликонами проводили реамплификацию с аналогичными праймерами, один из которых (Univ518F-GC) имел богатый Г + Ц нуклеотидами 5' конец (5'- CGCCCGCCGCGCCCCGCGC-CCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGTGBCAGC-MGCCGCGGTAA-3'). Амплификацию проводили на амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 ("Applied Biosystem", ФРГ) в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2.5 мкл 10× буферного раствора, 2.5 мМ $MgCl_2$, 0.25 мМ каждого dNTP, 0.2 мМ каждого праймера, 0.06 U/мкл *Taq* полимеразы ("Fermentas") и 5–10 нг DNA. Условия проведения ПЦР реакции описаны ранее (Muyzer et al., 1998; Kublanov et al., 2009). Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле. Полученные ампликоны разделяли в 8% полиакриламидном геле с относительным градиентом концентрации денатурирующих агентов от 30 до 70% на приборе TV400-DGGE ("SCIE-PLAS", Великобритания) в течение 18 ч при 70 V и 60°C. После электрофореза гель промывали в воде (MQ) и окрашивали SYBR Green I ("BioDye", РФ) в течение 40 мин в темноте. После окрашивания гель визуализировали при длине волны 470 нм. Кластерный анализ (иерархическая кластеризация) и аппроксимацию ранговых распределений полос по результатам ДГГЭ проводили с использованием программы Statgraphics ("Manugistics Inc.", США) по методу Варда (Ward's method), основываясь на сумме квадратов евклидовых расстояний. Оцифровку интенсивности полос в ДГГЭ гелях проводили с использованием программы "ImageJ", версия 1.45s.

В настоящей работе мы стремились идентифицировать именно метаногенных архей, активность которых и определяет выход метана в составе биогаза в анализируемых консорциумах. Для идентификации метаногенов, входящих в микробные консорциумы, мы использовали анализ SSCP по методике, описанной ранее (Schweieger, Tebbe, 1998) с последующим секвенированием полученных фрагментов ДНК. Для амплификации использовали специфичные праймеры для архей: Arc333F (TCCAGGCCCTAC GGG G) (Gieg et al., 2008) и Arc915R (GTGCTCCCCCGCCAATTCCT) (Stahl, Amann, 1991). ПЦР продукты инкубировали при 37°C 120 мин с 10 единицами λ-экзонуклеазы в реакционной смеси, включающей также 1 мкл λ-экзонуклеазы, 2 мкл буферного раствора и 17 мкл очищенного ПЦР продукта. Одноцепочечную ДНК очищали с помощью QIAEX PCR purification Kit (Qiagen, ФРГ) и высушивали на роторном испарителе. Осадок ресуспендировали в 2 мкл воды (MQ), добавляли 2 мкл SSCP буфера (95% формамид, 0.05% ксилен цианол и 0.05% бромфеноловый синий), инкубировали при 95°C в течение 2 мин и остужали на льду. Раствор вносили в полиакриламидный гель, который готовили смешиванием 6 мл MDE (Mutation Detection Enhancement, "Lonza", США) раствора, 4 мл 5× TBE (Tris Borate EDTA) и 11 мл MQ воды. После добавления 8 мкл TEMED и 40 мкл 10% персульфата аммония гель оставляли для полимеризации на 2 ч. Электрофорез осуществляли в Macrophor

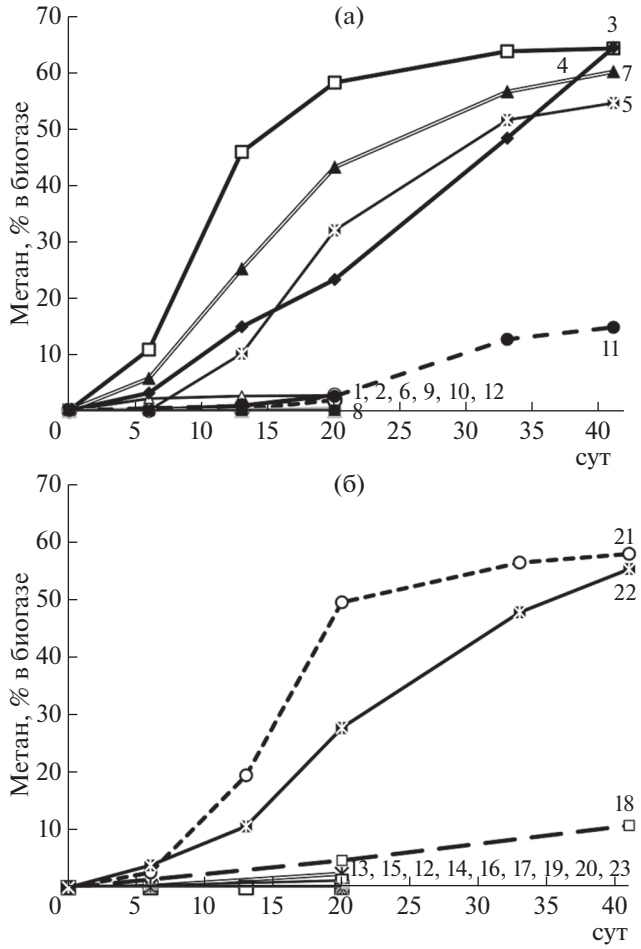

Рис. 1. Динамика образования метана (%) термофильными микробными сообществами № 1–12 (а) и № 13–23 (б) в процессе биоконверсии биомассы *A. variabilis* при 55°C. Данные представлены средним арифметическим из 3 повторностей; вариабельность значений внутри эксперимента не превышала 7%. Источники выделения сообществ № 1–23 описаны в разделе “Материалы и методы”.

(Германия) при 20°C в 1× TBE при 400 V в течение 16 ч, затем окрашивали, используя нитрат серебра. Полоски вырезали и переносили в 0.5 мл пластиковые пробирки эппендорф, содержащие 25 мкл буфера (10 мМ *Трис*-Base, 5 мМ KCl, 1.5 мМ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1% Тритон X100, pH 9.0) и нагревали при 95°C в течение 10 мин. Одноцепочечные ДНК реамплифицировали, используя те же пары праймеров. Очистка ПЦР продуктов проводилась с использованием MinElute 96 PCR purification Kit (“Quiagen GmbH”) согласно рабочему протоколу. Предварительный анализ сиквенсов был сделан с помощью программ Lasergene (DNASTAR) и VectorNTI (“Invitrogen”). Поиск гомологичных последовательностей проводили при помощи BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) в базе данных Genbank [nucleotide collection (nr/nt)] NCBI (National Center for Biotechnology Information).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образование биогаза термофильными микробными сообществами, разлагающими биомассу цианобактерий. С целью определения наиболее активных метаногенных консорциумов, способных эффективно проводить биотрансформацию фототрофной биомассы *A. variabilis* в биогаз, были использованы 24 выделенных ранее микробных сообщества (Цавкелова и соавт., 2012а), где исходный посевной материал для сообществ № 1 и 2 исходно был получен из компостных куч, для № 3 и 4 – из жома красного и белого винограда соответственно; инокулятом для сообщества № 5 служил помет кролика, для № 6 и 7 – навоз крупного рогатого скота (КРС), для № 19–23 – навоз зебры, пони, антилопы гну, черной антилопы и слона соответственно (Зоопарк, Москва). Для сообществ № 8–13 инокулят был отобран из пресноводных термофильных водоемов Камчатки, а для сообществ № 14–18 – из иловых донных отложений прудов и водоемов (Тверская обл.). Выделенные консорциумы культивировали на целлюлозе (фильтровальная бумага), после чего использовали в качестве инокулята при разложении биомассы цианобактерий *A. variabilis*. Большинство из изученных микробных консорциумов не проявили метаногенной активности вообще или содержание метана в составе биогаза не превышало 5–15% (рис. 1), однако несколько из них оказались достаточно эффективными. Наибольшую активность конверсии биомассы фототрофов в биогаз в термофильных условиях (более 60% метана) имели сообщества № 3, 4 и 7 (рис. 1а, 1б). Выход биогаза более 55% был обнаружен при использовании сообществ № 21 и 22, выделенных из навоза травоядных копытных (антилоп). Однако для образования максимальных количеств кумулятивного содержания метана микробным сообществам требовалось около 1.5 мес. культивирования.

Ранее мы показали, что при конверсии в биогаз исходного целлюлозосодержащего субстрата – фильтровальной бумаги, наиболее активными микробными консорциумами оказались № 3, 6, 21 и 22, образовывавшие 53.5, 56.3, 58.4 и 56.6% метана, соответственно, а сообщества № 4 и 7 выделяли, соответственно, 47.5 и 53.9% метана (Цавкелова и соавт., 2012а). В настоящей работе сообщество № 6 оказалось неэффективным для биоконверсии фототрофной биомассы, в то время как сообщество № 7 сохранило свою активность, так же как и сообщества № 21 и 22. В то же время, достаточно активные для биоконверсии бумажной продукции, в том числе картона, сообщества 17 и 18 (Цавкелова и соавт., 2012б), выде-

ленные из донных отложений и образовывавшие около 54% метана в составе биогаза, оказались неэффективными при культивировании на биомассе *A. variabilis* (рис. 1б).

Ранее (Gasanova et al., 2006) при использовании непрерывного биореактора с мезофильным анаэробным сообществом, совмещенного с фотобиореактором для культивирования *A. variabilis*, удавалось достигнуть выхода метана до 68% в биогазе. Максимальный выход метана в наиболее активных сообществах в процентном отношении от биогазовой смеси, а также в молях CH_4 в пересчете на литр среды и на грамм биомассы представлены в таблице 1. Суммарное содержание метана в составе биогаза было достаточно высоким (55–64%), однако при пересчете количества CH_4 на г биомассы значения продукции метана не превышали 4–5 ммоль CH_4/г. В то же время, эти же сообщества (№ 3, 4, 7, 21 и 22) при конверсии в биогаз целлюлозы (на примере фильтровальной бумаги) образовывали 16.6, 10.5, 16.2, 15.6 и 13.4 ммоль CH_4/г соответственно, что говорит о значительно менее эффективной биоконверсии в метан биомассы *A. variabilis*. Тем не менее, предложенный нами подход, выражающийся в селекции микробных целлюлозолитических консорциумов на фильтровальной бумаге и последующее однократное использование такого инокулята для биоконверсии цианобактериалной биомассы является перспективным, особенно учитывая тот факт, что исходно, при получении накопительных культур, нам вообще не удалось выделить сколько-нибудь активные микробные консорциумы, когда посевной материал из различных экониш (№ 1–24) добавляли к среде, содержащей исключительно биомассу *Anabaena*. При длительном культивировании и последовательных пересевах на биомассе *A. variabilis* в качестве единственного источника углерода и энергии, было также отмечено постепенное сокращение образуемого биогаза вплоть до показателей содержания кумулятивного метана, не превышавшего 25% (данные не представлены). Другие авторы (Ras et al., 2011; Bruhn et al., 2011) также отмечают следующие трудности при образовании биогаза из водорослей *Chlorella vulgaris* и *Ulva lactura*: необходимость концентрирования и частичное обезвоживание их биомассы для получения ее оптимальных количеств для анаэробного разложения. Использование технологий, совмещающих производство и биоконверсию альгобиомассы, позволило авторам получить максимальный выход метана [240 мл/г COD (chemical oxygen demand)] за 28 дней HRT (hydraulic retention time), однако при этом 50% биомассы оставалось неиспользованной и при более длительном культивировании.

В настоящей работе мы показали активность четырех термофильных микробных консорциумов в отношении разложения биомассы цианобактерии *A. variabilis* с образованием биогаза, а предварительная селекция сообществ на целлюлозе позволила выделить наиболее эффективные консорциумы. В то же время необходимо принимать во внимание, что биомасса *A. variabilis* была предварительно сконцентрирована и заморожена при –20°C с последующим размораживанием, что может рассматриваться как дополнительная предобработка субстрата. Поскольку биомасса фототрофных микроорганизмов не содержит лигнина, необходимости в энергетически затратных способах ее предобработки нет, однако механическое разрушение клеток имеет положительное влияние на последующее образование биогаза (Montingelli et al., 2015), например, ультразвуковое диспергирование микроводоросли *Ch. vulgaris* улучшало анаэробное разложение ее биомассы (Park et al., 2013).

Изучение структуры микробных сообществ. Состав метаногенных консорциумов, используемых в качестве инокулята, играет существенную роль при анаэробном биоразложении органических соединений, в частности за счет сбалансированности популяций синтрофов и метаногенов (Ali Shah et al., 2014). Поэтому зачастую навоз жвачных животных является наиболее оптимальным источником для селекции необходимых микроорганизмов с точки зрения разнообразия представленных трофических групп, а также высокой активности целлюлозолитических бактерий (Song, Clarke, 2009). Среди полученных микробных консорциумов (№ 1–23), выделенных из различных экониш, наиболее активными оказались четыре, исходно полученные из жома винограда (№ 3 и 4) и навоза травоядных жвачных животных: КРС и антилопы гну, № 7 и 21 соответственно). Ранее с помощью световой микроскопии мы выявили различия в морфологии микроорганизмов, обнаруживаемых в микробных сообществах, выделенных из различных источников, а также в динамике селекции этих консорциумов (Цавкелова и соавт., 2012а). Для более четкой визуализации отличий в составе бактериальной компоненты между исходным изолятом (накопительной культурой) и селектированными на бумаге сообществами, использованными в качестве инокулята для биоконверсии биомассы цианобактерий в биогаз, мы провели сравнительный DGGE анализ, который позволяет определить различия в составе доминирующих популяций микроорганизмов (рис. 2). Сравнение состава *Bacteria* исследованных термофильных сообществ, культивируемых в течение нескольких пассажей на целлюлозе, подтвердило различия в биоразнообразии бактериальной компоненты консорциумов, выделенных исходно из различных экониш. Кроме того, после разделения ампликонов DGGE показал, что во всех пробах разнообразие и интенсивность (яркость) полос отличались между исходным и

Таблица 1. Показатели выхода метана в составе биогаза, образуемого термофильными сообществами на биомассе *A. variabilis* при 55°C

№	Показатели	Максимальное содержание и образование метана
3	CH_4 (содержание в биогазе, %)	64.36
	ммольCH_4/л среды	57.07
	ммольCH_4/г биомассы	3.80
4	CH_4 (содержание в биогазе, %)	64.53
	ммольCH_4/л среды	73.00
	ммольCH_4/г биомассы	4.87
5	CH_4 (содержание в биогазе, %)	54.64
	ммольCH_4/л среды	34.36
	ммольCH_4/г биомассы	2.29
7	CH_4 (содержание в биогазе, %)	60.22
	ммольCH_4/л среды	54.61
	ммольCH_4/г биомассы	3.64
21	CH_4 (содержание в биогазе, %)	57.87
	ммольCH_4/л среды	61.76
	ммольCH_4/г биомассы	4.11
22	CH_4 (содержание в биогазе, %)	55.22
	ммольCH_4/л среды	47.41
	ммольCH_4/г биомассы	3.16

конечными микробными сообществами (рис. 2а). Например, в пробах № 3 и 4, выделенных, соответственно, из жома красного и белого виноградов, отмечено появление группы полос, которые не обнаруживались в исходных изолятах. В сообществе № 21, наряду с появившимися полосами, часть полос, отчетливо заметных в исходных изолятах, наоборот, исчезли. Проведенный кластерный анализ распределений риботипов подтвердил значимые изменения в составе бактериальных сообществ, произошедшие в процессе их селекции на бумаге в течение нескольких (пяти) пассажей на протяжение полугода. Так, если в инокулятах (рис. 2б) наиболее сходными по составу являются сообщества № 3 и 4, выделенные из жома красного и белого виноградов, а наиболее отдаленным от них по составу – микробное сообщество КРС (№ 7), то в процессе селекции, различия этих трех сообществ, наоборот, заметно снизились. В процессе селекции изменился не только качественный (число регистрируемых полос), но и количественный (яркость полос) состав микробных сообществ, что может быть связано, например, с накоплением и возросшей активностью синтрофных микроорганизмов в сообществе, наличие которых зачастую и определяет эффективность метаногенеза в микробных консорциумах (Maus et al., 2016). Однако данное предположение требует дальнейшего исследования и полного (метагеномного) анализа изученных сообществ с целью не только качественной, но и количественной (процентное содержание) оценки входящих в них бактериальных популяций.

Для определения состава и идентификации метаногенных архей – продуцентов биогаза в составе наиболее активных сообществ, способных разлагать биомассу *A. variabilis*, был проведен SSPE анализ, результаты которого представлены на рис. 3. При анализе разнообразия *Archaea* было показано, что в исследуемых сообществах именно метаногены являются доминирующей группой микроорганизмов. Было обнаружено сходство по-

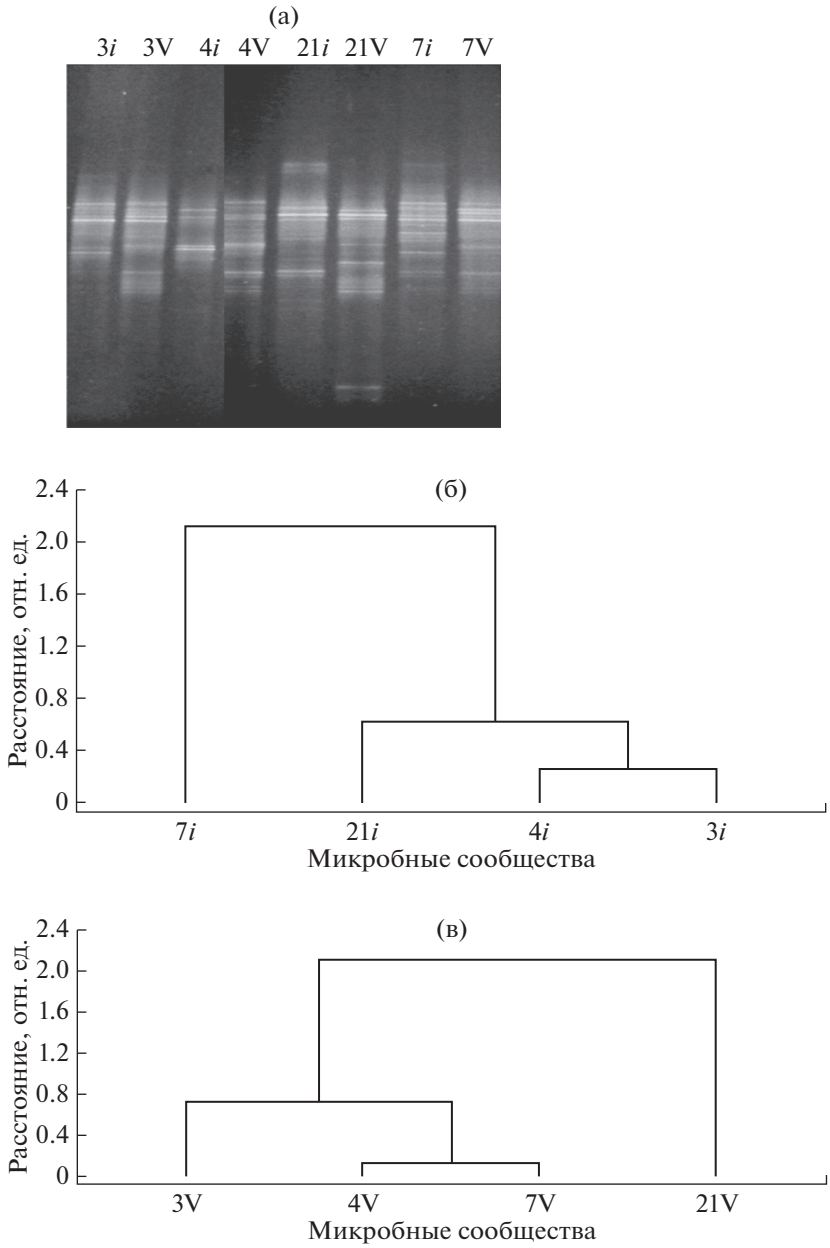

Рис. 2. (а) – DGGE профили бактериальной компоненты микробных сообществ № 3, 4, 7 и 21: исходного изолята (*i*; первый пассаж) и пятого пассажа (V), селектированных на целлюлозе (фильтровальная бумага). Выделение и селекция метаногенных микробных сообществ из различных экологических ниш описаны ранее (Цавкелова и соавт., 2012а). (б, в) – Кластерный анализ доминирующих групп бактериальных сообществ на основе риботипов, полученных в DGGE профиле, для исходных сообществ (б) и пятого пассажа (в). Обозначения: 3*i*, 4*i*, 21*i* и 7*i* – сообщества получены из жома красного винограда, жома белого винограда, навоза антилопы и навоза КРС соответственно. Амплификацию ПЦР продуктов проводили с праймерами Univ515F-Bact907R с последующей реамплификацией с праймерами Univ518F-GC-Bact907R.

лученных профилей для микробных сообществ № 3, 7, 18 и 21. Полоса А1 принадлежит к *Methanoculleus* sp. (идентичность 97% сходства с *Methanoculleus thermophilus* DSM 2832, номер в генбанке AJ862839) из семейства *Methanomicrobiaceae*, а полоса А2 – к некультивируемому представителю *Methanosarcina* sp. (99% сходства со штаммом TDS-J-r-A03, номер в генбанке B353208). Полосы А3 и А4 после секвенирования оказались одним и тем же микроорганизмом, показавшим 98% сходства с *Methanogenium thermophilum* (номер в генбанке M59129), который, однако, переопределен и представлен в генбанке как принадлежащий к *Methanoculleus thermophilus*. Таким образом, в изу-

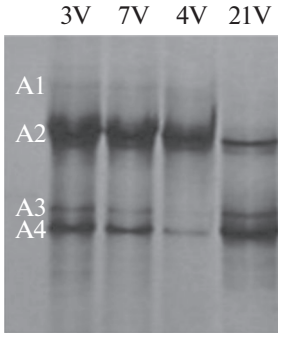

Рис. 3. SSCP-фореграмма архейной компоненты микробных сообществ № 3, 4, 7 и 21 после пятого пассажа (V) при селекции на целлюлозе (фильтровальная бумага), выделенных ранее (Цавкелова и соавт., 2012а) из жома красного и белого винограда, навоза КРС и навоза антилопы гну соответственно. Амплификацию ПЦР продуктов проводили с праймерами Arc333F-Arc915R. Обозначения: A1, A3, A4 – *Methanoculleus* sp.; A2 – *Methanosarcina* sp.

ченных микробных сообществах метаногенез проходит, по-видимому, в основном по гидрогенотрофному пути, поскольку представители *Methanoculleus* являются гидрогенотрофными метаногенами, а представители рода *Methanosarcina* способны к биосинтезу метана и гидрогенотрофно, и ацетокластически (Ali Shah et al., 2014; Esquivel-Elizondo et al., 2016). Разнообразие метаногенов оказалось сходным для микробных сообществ, проявивших наибольшую активность при разложении биомассы *A. variabilis* с образованием биогаза. *Methanoculleus thermophilicus* (гидрогенотрофный) и *Methanosarcina thermophila* (ацетотрофный) считаются доминирующими видами при анаэробном разложении органики с использованием навоза КРС (Ali Shah et al., 2014). Пластичность метаболизма метаносарцины делает ее более толерантной к специфическим ингибиторам ацетокластического метаногенеза, а также к повышенному содержанию аммония в среде. *Methanobacteriales*, а также *Methanosarcina* могут превалировать среди гидрогенотрофных метаногенов в термофильных сообществах. В то же время в последние годы накапливается все больше данных о том, что в термофильных условиях более значимую роль играют ацетатокисляющие синтрофные бактерии (АОСБ), окисляющие ацетат в H_2 и CO_2, которые затем используются гидрогенотрофными метаногенами (Hattori, 2008; Maus et al., 2016). Учитывая тот факт, что во всех исследованных микробных сообществах в процессе селекции на целлюлозосодержащем субстрате доминирующие популяции метаногенов оказались сходными, можно также предположить, что существенное влияние на эффективность утилизации и биоконверсии как целлюлозы, так и биомассы *A. variabilis* в метан, может иметь именно разнообразие и количество синтрофных, в том числе АОСБ бактерий, находящихся в составе анаэробных термофильных консорциумов. Дальнейшее изучение и идентификация доминирующих бактериальных популяций необходимы не только для определения метаболической активности и трофических связей внутри выделенных сообществ, но и с целью оптимизации термофильного процесса образования биотоплива (биогаза) при использовании таких трудноразлагаемых субстратов, как целлюлоза и биомасса фототрофных микроорганизмов.

Авторы благодарят сотрудников каф. микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова: А.И. Шестакова за помощь в проведении хроматографического анализа и к. б. н. О.Р. Коцюрбенко за помощь в проведении SSCP анализа. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-14-00098.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Прокудина Л.И., Осмоловский А.А., Егорова М.А., Малахова Д. В., Нетрусов А.И., Цавкелова Е.А. Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов микромицетами с последующей биоконверсией в биогаз // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 2. С. 200–209.

Prokudina L.I., Osmolovskiy A.A., Egorova M.A., Malakhova D.V., Netrusov A.I., Tsavkelova E.A. Biodegradation of cellulose-containing substrates by micromycetes followed by bioconversion into biogas // Appl. Biochem. Microbiol. V. 52. P. 190–198.

Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И. Термофильные анаэробные микробные сообщества, разлагающие целлюлозу с образованием метана (биогаза) // Вестник МГУ. Сер. биол. 2012а. № 2. С. 36–42.

Tsavkelova E.A., Egorova M.A., Petrova E.V., Netrusov A.I. Thermophilic anaerobic microbial communities that transform cellulose into methane (biogas) // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. V. 67. № 2. P. 75–81.

Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И. Образование биогаза микробными сообществами при разложении целлюлозы и пищевых отходов // Прикл. биохимия и микробиология. 2012б. Т. 48. № 4. С. 417–424.

Tsavkelova E.A., Egorova M.A., Petrova E.V., Netrusov A.I. Biogas production by microbial communities via decomposition of cellulose and food waste // Appl. Biochem. Microbiol. V. 48. P. 377–384.

Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И. Получение биогаза из целлюлозосодержащих субстратов (Обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 469–483.

Tsavkelova E.A., Netrusov A.I. Biogas production from cellulose-containing substrates (a review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 421–433.

Ali Shah F., Mahmood Q., Maroof Shah M., Pervez A., Ahmad Asad S. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis // Sci. World J. 2014. http://dx.doi.org/. doi 10.1155/2014/183752

Ambulkar A.R., Shekdar A.V. Prospects of biomethanation technology in the Indian context: a pragmatic approach // Res. Conserv. Recycl. 2004. V. 40. P. 111–128.

Antizar-Ladislao B., Turrion-Gomez J.L. Second-generation biofuels and local bioenergy systems // Biofuels, Bioprod. Bioref. 2008. V. 2. P. 455–469.

Bruhn A., Dahl J., Nielsen H.B., Nikolaisen L., Rasmussen M.B., Markager S., Olsen B., Arias C., Jensen P.D. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: biomass yield, methane production and combustion // Biores. Technol. 2011. V. 102. P. 2595–2604.

Dębowski M., Zieliński M., Grala A., Dudek M. Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies – Review // Ren. Sustain. Energy Rev. 2013. V. 27. P. 596–604.

Esquivel-Elizondo S., Parameswaran P., Delgado A.G., Maldonado J., Rittmann B.E., Krajmalnik-Brown R. Archaea and Bacteria acclimate to high total ammonia in a methanogenic reactor treating swine waste // Archaea. 2016. http://dx.doi.org/. doi 10.1155/2016/4089684

Eze J.I., Uzodinma E.O. Generation of methane gas from poultry brooding house // Pacific J. Sci. Technol. 2009. V. 10. P. 942–948.

Fargione J., Hill J., Tilman D., Polasky S., Hawthorne P. Land clearing and the biofuel carbon debt // Science. 2008. V. 319. № 5867. P. 1235–1238.

Gasanova L.G., Netrusov A.I., Teplyakov V.V., Modigell M. Fuel gases from organic wastes using membrane bioreactors // Desalination. 2006. V. 198. № 1–3. P. 56–66.

Gieg L.M., Duncan K.E., Suflita J.M. Bioenergy production via microbial conversion of residual oil to natural gas // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 3022–3029.

Hattori S. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments // Microbes Environ. 2008. V. 23. P. 118–127.

Johansson D., Azar C.A. A scenario based analysis of land competition between food and bioenergy production in the US // Climate Change. 2007. V. 82. P. 267–291.

Kublanov I.V., Perevalova A.A., Slobodkina G.B., Lebedinsky A.V., Bidzhieva S.K., Kolganova T.V., Kaliberda E.N., Rumsh L.D., Haertlé T., Bonch-Osmolovskaya E.A. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolitic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia) // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 286–291.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.: Cold Spring Harbor, 1982. 545 p.

Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review // Renew. Sust. Energ. Rev. 2010. V. 14. P. 217–232.

Mata-Alvarez J., Macé S., Llabrés P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives // Biores. Technol. 2000. V. 74. P. 3–16.

Maus I., Koeck D.E., Cibis K.G., Hahnke S., Kim Y.S., Langer T., Kreubel J., Erhard M., Bremges A., Off S., Stolze Y., Jaenicke S., Goesmann A., Sczyrba A., Scherer P., König H., Schwarz W.H., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schlüter A., Klocke M. Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates // Biotechnol. Biofuel. 2016. V. 9:171.

Montingelli M.E., Tedesco S., Olabi A.G. Biogas production from algal biomass: a review // Renew. Sustain. Energy Rev. 2015. V. 43. P. 961–972.

Muyzer G., Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. V. 73. P. 127–141.

Nobles D.R., Romanovicz D.K., Brown Jr. R.M. Cellulose in Cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? // Plant Physiol. 2001. V. 127. P. 529–542.

Park K.Y., Kweon J., Chantrasakdakul P., Lee K., Young Cha H. Anaerobic digestion of microalgal biomass with ultrasonic disintegration // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2013. V. 85. P. 598–602.

Ras M., Lardon L., Bruno S., Bernet N., Steyer J.-P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* // Biores. Technol. 2011. V. 102. P. 200–206.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.J. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *Cyanobacteria* // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 111. P. 1–61.

Schweieger F., Tebbe C.C. A New approach to utilize PCR–single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 4870–4876.

Searchinger T., Heimlich R., Houghton R., Dong F., Elobeid A., Fabiosa J., Tokgoz S., Hayes D., Yu T.-H. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change // Science. 2008. V. 319. № 5867. P. 1238–1240.

Song H., Clarke P. Cellulose hydrolysis by a methanogenic culture enriched from landfill waste in a semi-continuous reactor // Biores. Technol. 2009. V. 100. P. 1268–1273.

Stahl D.A., Amann R. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematic // Nucleic acid techniques in bacterial systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1991. P. 205–248.

Vanegas C.H., Barlett J. Green energy from marine algae: biogas production and composition from the anaerobic digestion of Irish seaweed species // Environ. Technol. 2013. V. 34. P. 2277–2283.

Yen H.-W., Brune D.E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane // Biores. Technol. 2007. V. 98. P. 130–134.

Anerobic Cellulolytic Microbial Communities Decomposing the Biomass of *Anabaena variabilis*

E. V. Petrova[1], M. A. Egorova[1], N. F. Piskunkova[1], P. A. Kozhevin[2], A. I. Netrusov[1], and E. A. Tsavkelova[1], #

[1]*Department of Microbiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

[2]*Department of soil biology, Faculty of soil Sciences, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

#e-mail: tsavkelova@mail.ru

Received May 24, 2017

Abstract—Four previously isolated methanogenic anaerobic consortia, which were originally cultivated on a cellulose-containing substrate (filter paper), were used as inocula for the anaerobic conversion of the biomass of *Anabaena variabilis* into biogas at 55°C. The cumulative methane yield in the biogas produced by the most active consortia reached 64%. However, the biotransformation was only efficient in the course of the single inoculation and pretreatment of the cyanobacterial biomass by its concentration and freeze-thawing. The DGGE analysis of the structure of the selected microbial consortia, cultivated on the filter paper, revealed qualitative variations in the biodiversity of predominant *Bacteria*, showing differences in band number and intensity. The composition of methanogenic *Archaea* in these consortia was similar, with the presence of the genera *Methanoculleus* and *Methanosarcina*. The efficiency of the microbial consortia selection, and the role of the various microbial trophic groups in bioconversion of the substrates, such as cellulose and the biomass of phototrophic microorganisms are discussed.

Keywords: thermophilic microbial consortium, methanogens, biogas, bioconversion, cellulose, biomass of phototrophs