

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»

На правах рукописи



Попова Любовь Ильинична

**Микробное разложение целлюлозосодержащих
субстратов с образованием биотоплива**

03.02.03 - микробиология

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Научные
руководители**

Нетрусов Александр Иванович

доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Цавкелова Елена Аркадьевна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Официальные
оппоненты**

Градова Нина Борисовна

доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РХТУ имени Д.И. Менделеева

Ножевникова Алла Николаевна

доктор биологических наук, зав. лабораторией микробиологии антропогенных мест обитания ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Синеокий Сергей Павлович

доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт»», директор БРЦ ВКПМ

Защита диссертации состоится 17 декабря 2019 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.13 при ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.12, факультет почвоведения, аудитория М-2. Тел: 8(495)-939-35-46, E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/248101786/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.



Костина Н.В.

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Поиск альтернативных источников топлива и экологических способов утилизации органических отходов, а также связанные с этим изменения инфраструктуры, которые могли бы конкурировать и впоследствии заменить имеющиеся технологии по добыче традиционных видов топлива, являются актуальными и востребованными в отечественных и мировых исследованиях. Одну из ведущих ролей в этом играет биоэнергетика, использующая различные типы биотоплива, которые, в большинстве своём, образуются при непосредственном участии микроорганизмов. Наибольшее распространение имеет получение биогаза в результате микробиологической переработки отходов сельского хозяйства и животноводства, различных видов органических бытовых, муниципальных и промышленных отходов и стоков. Преимущество биоконверсии органических субстратов с помощью ферментов микробного происхождения, сообществ микроорганизмов или их чистых культур заключается в том, что в результате трансформации в биотопливо помимо конечных продуктов, отходы этих процессов могут служить биоудобрениями, что позволяет создать полностью безотходные технологии (Василов, 2007; Borjesson and Mattiasson, 2008).

Среди наиболее востребованных видов биотоплива на основе активности микроорганизмов выделяют биоспирты (этанол, метанол, бутанол), биодизель, биогаз и биоводород. Все больше применение вновь находит биобутанол, который по своей энергоёмкости практически соответствует бензину (Dürre, 2007; Swana et al., 2011), а также биогаз, который используется около 38%-ми мирового населения (Sehgal, 2018). Однако доля использования биоэнергетики в России составляет менее 1% (Елисеева и др., 2013), при этом большая часть биотопливного рынка представлена производством твёрдых видов топлива, а именно топливных пеллет (прессованные отходы деревообработки). В то же время, из органических отходов, которые на сегодняшний день составляют по всей России около 700 млн т, возможно по предварительным оценкам получение более 58 млрд м³ биогаза, до 88 млн м³ водорода и до 165 тыс т растворителей (бутанол и ацетон) (Елисеева и др., 2013; Назаров и Корнеева, 2013; Сусану, 2019).

Несмотря на то что всё больше исследований появляется в области зелёных биотехнологий, широкое их использование пока что ограничено из-за ряда нерешённых фундаментальных и прикладных вопросов. В частности, использование микробных сообществ или бинарных культур для получения биотоплива предполагает одновременное или последовательное культивирование двух и более штаммов микроорганизмов, обладающих

различными трофическими потребностями и связями, а также метаболическими характеристиками (например, группы, относящиеся к гидролитикам, синтрофам, метаногенам, бродильщикам). Применение микробных сообществ зачастую позволяет расширить спектр используемых субстратов и получить более высокие показатели продуктивности по сравнению с чистыми культурами, однако, взаимодействие между микроорганизмами в подобных консорциумах представляет многопараметрическую систему, функционирование и эффективность которой напрямую зависит от состава микробных сообществ, их физиологических параметров роста и активности, а также трофических взаимодействий, обеспечивающих конверсию субстратов в продукты их метаболизма.

Для успешного использования в биотехнологии микробных сообществ, утилизирующих трудноразлагаемые органические отходы, в том числе содержащие целлюлозу, которая является одним из наиболее распространённых соединений, требуется проведение ряда фундаментальных и комплексных исследований, направленных на изучение состава микробных консорциумов, поведения культур при их совместном выращивании и активности штаммов в зависимости от используемых субстратов, требуется селекция наиболее эффективных микробных сообществ, способных стабильно осуществлять биоконверсию целлюлозосодержащих субстратов в биотопливо, а также оптимизация условий культивирования таких консорциумов. Исследование этих вопросов обуславливает значимость и актуальность выполненной работы.

Цель работы - исследовать фундаментальные и прикладные аспекты биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в биотопливо на примере образования биогаза и биобутанола с помощью анаэробных микробных сообществ.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

- провести выделение и селекцию стабильных метаногенных анаэробных микробных сообществ (далее МС), активно разлагающих различные целлюлозосодержащие субстраты (органические отходы, биомассу растений, бумажную продукцию) в биогаз и оптимизировать условия для культивирования МС и биоконверсии субстратов;

- изучить возможность использования грибов на примере *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus* для предобработки лигноцеллюлозного сырья и оценить их целлюлозолитическую активность;

- изучить возможность полной утилизации целлюлозосодержащих производственных отходов на примере пивной дробины в качестве субстрата для получения биогаза и биоудобрения;

- провести анализ структуры и определить состав метаногенного сообщества, эффективно конвертирующего целлюлозосодержащие субстраты (ЦСС) в биогаз;
- провести выделение и идентификацию чистых культур анаэробных целлюлозолитических бактерий;
- подобрать культуры и условия для применения бинарно-последовательной анаэробной ко-культуры, состоящей из целлюлозолитического и способного к ацетоно-бутиловому брожению микроорганизмов, для биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в АБЭ продукты (ацетон, бутанол, этанол).

Научная новизна

На примере анаэробных мезофильных и термофильных метаногенных сообществ был исследован процесс биоконверсии различных типов бумажной продукции и целлюлозосодержащих отходов в биогаз. Изучен состав консорциума микроорганизмов (бактерии и археи), входящих в эффективные термофильные метаногенные целлюлозолитические сообщества. Анализ структуры микробных сообществ, проведённый с использованием современных методов денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГТЭ) и высокопроизводительного секвенирования (ВПС), позволил выявить доминирующие и минорные популяции бактерий и архей, идентифицировать представителей и определить роль термофильных синтрофных ацетат-окисляющих бактерий в этом процессе. Также к фундаментальным аспектам работы относится изучение целлюлозолитической активности грибов (на примере *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus*) в отношении предобработки различных целлюлозосодержащих субстратов (бумажная продукция, фитомасса топинамбура) для дальнейшего их сбраживания микробными метаногенными сообществами.

При выделении чистых культур целлюлозолитических бактерий из селектированных анаэробных термофильных сообществ были выделены изоляты *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, способные к разложению целлюлозы. Изучена возможность использования микробных сообществ, а также бинарно-последовательных ко-культур для биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в АБЭ-продукты. Впервые в составе бинарной ко-культуры были использованы не только дикie типы термофильной целлюлозолитической культуры *Clostridium thermocellum* DSM 1237 и мезофильного штамма *C. acetobutylicum* ATCC 824, осуществляющего ацетоно-бутиловое брожение, но и рекомбинантный штамм *C. acetobutylicum* rex:int. Оптимизация условий культивирования и сопряжения этих двух процессов продемонстрировала увеличение общего

выхода нейтральных продуктов брожения в сравнении с имеющимися литературными данными.

Теоретическая и практическая значимость работы

Практическая ценность работы заключается в моделировании биотехнологического процесса безотходной утилизации анаэробными микробными сообществами различных целлюлозосодержащих субстратов: пивной дробины, являющейся основным отходом пивоваренной промышленности, фитомассы растений (на примере *Helianthus tuberosus*), а также бумажной продукции. Показана важность селекции микробных сообществ в течение нескольких пассажей на целлюлозосодержащем субстрате, что позволяет получить не только более активные, но и стабильные в течение долгого времени консорциумы микроорганизмов. Были отобраны два наиболее активных микробных сообщества, осуществляющих разложение различных целлюлозосодержащих отходов с образованием биогаза, причём использование смешанных бумажных отходов, состоящих из легко- и трудноразлагаемых материалов, позволяет повысить эффективность их утилизации и биоконверсии.

Использование выбранных видов клостридий (*Clostridium thermocellum* и *C. acetobutylicum*) и подбор условий для их совместного последовательного культивирования (в том числе, использование повторной инокуляции) позволили увеличить эффективность биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов. Использование рекомбинантного штамма, *C. acetobutylicum* rex:int, а также введение этапа реинокуляции АБЭ-продуцента можно рассматривать как способы повышения эффективности ко-культур для их использования в биотехнологии. Полученные в работе данные могут быть применены для модернизации технологий по переработке целлюлозосодержащих отходов в биотопливо с помощью анаэробных чистых культур и сообществ микроорганизмов.

Положения выносимые на защиту

1. Выделены и селектированы мезофильные и термофильные анаэробные микробные сообщества, способные к биоконверсии в биогаз (с содержанием метана более 55%) различных целлюлозосодержащих субстратов: нескольких типов бумажной продукции, фитомассы топинамбура, а также органических производственных отходов. На примере пивной дробины показана возможность её полной утилизации в биогаз и биоудобрение.
2. Использование метода биологической предобработки лигноцеллюлозного сырья (на примере смеси бумаг и фитомассы топинамбура) с помощью микромицетов, образующих комплекс целлюлозолитических ферментов, увеличивает выход биогаза метаногенными сообществами по сравнению с непредобработанными

субстратами.

3. С помощью ДГГЭ-анализа и высокопроизводительного секвенирования впервые исследована структура и состав термофильных метаногенных целлюлозолитических сообществ, культивируемых при 55°C на средах с различными типами бумажной продукции. Среди ключевых групп выявлены представители целлюлозолитических бактерий, синтрофных ацетат-окисляющих бактерий и гидрогенотрофных метаногенных архей.

4. При выделении целлюлозолитических термофильных анаэробных бактерий обнаружено несколько изолятов, принадлежащих к *Thermoanaeracterium thermosaccharolyticum*, отличающихся от типового штамма (*T. thermosaccharolyticum* DSM 571) по своей способности к использованию целлюлозы.

5. Оптимизация бинарно-последовательного культивирования модельной ко-культуры *C. thermocellum* DSM 1237 и *C. acetobutylicum* ATCC 824 для биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в продукты ацетонобутилового брожения, а также. использование рекомбинантного штамма *C. acetobutylicum* rex: int увеличивают выход АБЭ продуктов.

Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментальной части, а также работ по сбору и анализу данных и написании диссертации. Все результаты получены самим автором или при непосредственном его участии в случае коллаборации. Автор принимал непосредственное участие в написании диссертации и при подготовке публикаций по материалам работы, ссылки на которые с указанием соавторов присутствуют в тексте работы.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих российских и международных конференциях: Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2014), 1-ый Российский Микробиологический конгресс (Пушино, Московская обл., 2017), 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM Annual Meeting (Вюрцбург, Германия, 2017).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из 7 разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 162 страницах компьютерного текста, содержит 41 рисунок и 23 таблицы. Список литературы включает 349 источников, из них 43 на русском и 306 на иностранных языках.

Основное содержание работы

Обзор литературы

Глава описывает три раздела: «Микробное разложение целлюлозосодержащих субстратов», «Биотехнологические аспекты биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в биотопливо» и «Бутанол как альтернативный источник биотоплива». Дано определение лигноцеллюлозосодержащего сырья (ЦСС) и его состава, а также рассмотрены процессы микробной деструкции ЦСС в аэробных и анаэробных условиях.

Материалы и методы

В качестве основных объектов данного исследования выбраны метаногенные целлюлозоразлагающие микробные сообщества, выделенные ранее из различных природных и антропогенных источников. В ходе исследования проведена селекция выбранных МС на следующих субстратах: отдельно взятых целлюлозосодержащих материалах, а также смеси бумажной продукции, состоящей из картона, фильтровальной, журнальной, газетной и офисной бумаг. Кроме того, использовали фитомассу - высушенные и размельченные листья и стебли топинабура (*Helianthus tuberosus* L.); в качестве промышленных отходов выбрана пивная дробина. С помощью микробиологических и ряда аналитических методов проведена оценка активности микробных консорциумов по изучению конверсии ЦСС в биогаз в течение нескольких пассажей. Для изучения влияния биологической предобработки субстратов на эффективность МС использовали культуры микромицетов *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus*.

Структуру активных МС изучали с помощью методов световой и сканирующей электронной микроскопии, а их состав - с помощью анализа последовательностей 16S рРНК, полученных при использовании метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ), а также с помощью высокопроизводительного секвенирования на базе платформы Illumina MiSeq.

Описаны методы выделения чистых культур термофильных анаэробных целлюлозолитических микроорганизмов и проведение их таксономического анализа по последовательности фрагмента гена 16S рРНК.

В экспериментах по созданию бинарно-последовательных ко-культур с биотехнологическим потенциалом для биоконверсии целлюлозы в бутанол использовали дикие типы *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 и *C. thermocellum* DSMZ 1237, а также трансгенный штамм *C. acetobutylicum* rex:int из коллекции лаборатории профессора Х. Баля (Ростокский университет, Германия) и коллекции микроорганизмов DSMZ.

Основные результаты и обсуждение

Образование биогаза анаэробными микробными сообществами из целлюлозосодержащего сырья

Ранее (Цавкелова и др., 2012) из различных источников было выделено несколько микробных сообществ, образующих биогаз при росте на фильтровальной бумаге. Наиболее продуктивные из них, образующие выше 50% метана в составе биогаза, были объединены для создания эффективных микробных консорциумов, способных к разложению различных ЦСС. Так, для расширения микробного разнообразия и потенциальных трофических взаимодействий были сформированы два суммарных термофильных микробных сообщества: $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$, состоящие из четырёх и семи исходных МС соответственно. Единственное суммарное мезофильное сообщество, объединённое из двух ранее активных сообществ, было исключено из дальнейших исследований, поскольку достижение максимального выхода метана происходило на 35 сутки культивирования, и процесс деструкции субстратов (фильтровальной и офисной бумаг) в биогаз занимал в 2 раза больше времени, чем при культивировании термофильных сообществ; при этом выход метана составил около 35 мл $\text{CH}_4/\text{г}$ субстрата, а содержание метана в биогазе - лишь около 20%. В то же время, в термофильных сообществах конверсия субстратов в биогаз была эффективнее: выход метана составил около 60%, а содержание метана в биогазе - около 150-220 мл $\text{CH}_4/\text{г}$ субстрата.

Для определения стабильности образования биогаза выбранными суммарными сообществами, их пересекали в течение трех пассажей (каждый пассаж длился 16-18 дней), в течение которых их активность не уменьшалась.

Помимо фильтровальной и офисной (с черно-белой печатью) бумаг, которые практически не содержат лигнин (0% и 1,2-1,4%) и состоят из целлюлозы на 100% и 78,6-84,9% соответственно (Yuan et al., 2012; Guerfali et al., 2015), были также использованы картон, газетная и журнальная бумаги, а также смесь, содержащая все типы бумаг (20% каждого типа). Два анализируемых суммарных МС ($\Sigma 4$ и $\Sigma 7$) отличались при анализе их активности, в том числе по содержанию метана в составе биогаза, а также по степени гидролиза исходного субстрата (рисунок 1).

Наиболее биоразлагаемым субстратом является офисная бумага, при этом максимальный объем биогаза, образуемого в пересчете на г исходного субстрата, составил 228,9 и 154,3 мл $\text{CH}_4/\text{г}$ для сообществ $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$, соответственно. Хуже всего биоразложению подвергались газетная и журнальная бумаги с 26,2% и 39,2% кумулятивного метана и около 58-59 мл общего объема образуемого биогаза сообществом $\Sigma 4$.

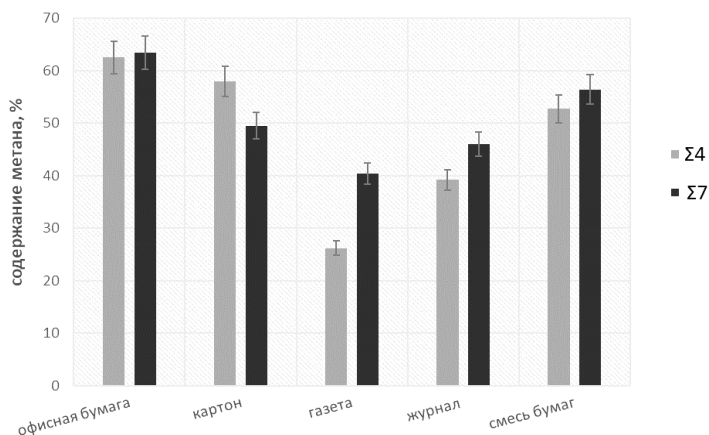


Рисунок 1. Выход метана при разложении различных типов бумажной продукции термофильными анаэробными сообществами $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$

Известно, что газетная бумага может содержать около 40-58% целлюлозы с 17-26%-ми гемицеллюлозы и достаточно высоким (11-20%) наполнением лигнина (Sun and Cheng, 2002; Chen et al., 2015). Кроме того, в такого типа бумагах содержатся красители и химические соединения, используемые при производстве и печати, которые также могут оказывать ингибирующее действие на рост микроорганизмов. Этими факторами объясняется менее эффективный гидролиз и биоконверсия в биогаз газетной и журнальной бумаг.

Несмотря на то что оба микробных сообщества несколько отличались в показателях образования биогаза, тем не менее, общая тенденция при биосинтезе метана на различных бумажных субстратах была сходной: от наибольшей активности на офисной бумаге и резкого снижения выхода биогаза на журнальной и газетной бумагах, до восстановления достаточно высокой продуктивности при использовании смеси бумаг. Так, кумулятивное содержание метана для $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ сообществ составило 52,7% и 56,4%, а общий объем образуемого биогаза - 188,3 мл и 175,7 мл, соответственно. Таким образом, оба МС показали эффективную биоконверсию трудноразлагаемых субстратов при их использовании в составе смеси бумаг с легкоразлагаемыми компонентами.

Биоконверсия целлюлозосодержащих субстратов в биогаз с помощью микромикетов и метаногенных сообществ

Для изучения возможности совмещения биологической предобработки лигноцеллюлозных субстратов с последующей их конверсией в биогаз мы исследовали активность микромикетов *Trichoderma viride* и

Aspergillus terreus. При гидролизе бумажных субстратов штамм *T. viride* оказался более эффективным: за исключением сходных показателей, полученных при культивировании обоих грибов на картоне (0,63 U/мл/мин у аспергилла и 0,49 U/мл/мин у триходермы), на остальных субстратах общая целлюлазная активность триходермы превышала таковую у аспергилла в 2,6 раз на офисной, в 3,1 раза на журнальной, в 2,7 раз на фильтровальной, в 1,7 раз на газетной бумагах и в 2,3 раза на смеси бумаг.

У обоих микромицетов при культивировании на смеси бумаг обнаружены высокие показатели целлюлазной активности, что свидетельствует о том, что микроорганизмы вырабатывают целый комплекс гидролаз и целлюлозолитических ферментов, включающий также гемицеллюлазы (Алимова, 2006; Kumar and Parikh, 2015) и лигнинолитические ферменты (Amore et al., 2013; Janusz et al., 2017). Эффективность гидролиза, возрастает благодаря синергизму действия всех ферментов. Для повышения эффективности утилизации лигноцеллюлозных субстратов были выбраны в качестве субстратов фитомасса топинамбура, офисная бумага и смесь бумаг. После предобработки грибом, субстрат и полученную биомассу использовали для дальнейшей биоконверсии в биогаз микробными сообществами, для чего вносили среду для роста метаногенов, заменяли воздушную фазу на аргон и вносили посевной материал (в количестве 10%). Инокулятом для развития метаногенного сообщества служили МС $\Sigma 4$, а также навоз крупного рогатого скота (КРС).

После предобработки кумулятивное содержание метана в биогазе при росте $\Sigma 4$ МС составило 20-52% при разложении смеси бумаг и 18-56% при разложении фитомассы топинамбура. При использовании КРС в качестве инокулята были получены более высокие значения выхода метана, особенно при использовании фитомассы топинамбура, что можно объяснить как содержанием дополнительных питательных веществ в данном типе инокулята, а также тем, что эти сообщества обладают большим исходным разнообразием бактерий и архей, их более высоким количественным содержанием и метаболической активностью (Amon et al., 2007; Castrillon et al., 2011).

Биоконверсия офисной бумаги проходит наилучшим образом в исходной (нулевой) точке культивирования гриба (без предобработки), что объясняется тем, что данный субстрат практически не содержит лигнин (1,2-1,4%; Guerfali et al., 2015) и в исходном виде подвергается полному гидролизу и биоконверсии в метан самим микробным сообществом. При использовании триходермы, офисная бумага полностью «съедается» грибом с потреблением образующихся сахаров. Напротив, при культивировании сообщества КРС на смеси бумаг было выявлено увеличение образования биогаза именно после предобработки культурой *T. viride*. Эффективность гидролиза субстрата и его конверсия в биогаз (объем метана в пересчете

на г субстрата) увеличивается в 2 раза при использовании предобработки смеси бумаг этим грибом (к 3-м суткам при сравнении с необработанным субстратом). При этом максимальное значение кумулятивного содержания метана составило 52,3%. Также предобработка фитомассы топинамбура микромицетом *T. viride* способствовала увеличению максимальных показателей образования биогаза (45%) микробным сообществом $\Sigma 4$. По сравнению с исходным (без предобработки) типом субстрата, выход метана увеличился в 1,5 раза. В то же время сообщество, выделенное из навоза КРС, наоборот, было наиболее эффективным в нулевой точке (56,3%) при обработке растительной биомассы. Таким образом, предобработка целесообразна при использовании лигноцеллюлозных субстратов для их последующей конверсии в биогаз с помощью селектированных микробных сообществ.

Изучение структуры и состава микробных анаэробных сообществ

Для изучения структуры и биоразнообразия входящих в исследуемые $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ сообщества микроорганизмов, они были проанализированы с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), а также с помощью молекулярно-биологических методов. Образцы для световой микроскопии и СЭМ отбирали в динамике в процессе селекции $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ МС. В результате были обнаружены разнообразные по форме морфотипы, среди которых преобладали длинные и короткие палочки, со спорами и без них, одиночные и соединенные в цепочки или скопления - микропопуляции. Большое количество обнаруженных споровых форм может говорить в пользу присутствия клостридиоподобных бактерий, которые обычно широко представлены в анаэробных сообществах в качестве гидролитиков, особенно значима их роль в гидролизе целлюлозы (Lynd et al., 2002). Анализ на основе СЭМ (рисунок 2) подтвердил результаты световой микроскопии: так, в образцах с трудноразлагаемыми журнальной и газетной бумагами микроорганизмы были представлены в небольшом количестве на протяжении всего этапа культивирования, споры были почти единственными обнаруженными клетками и в образце с журнальной бумагой. Напротив, наиболее интенсивное образование микробных популяций и биопленок было отмечено на легко разлагаемых субстратах, таких как офисная бумага и гофрированный картон, но также и на бумажной смеси. Активную колонизацию поверхности субстрата наблюдали уже через трое суток культивирования, при этом среди доминирующих морфотипов были обнаружены длинные и короткие утолщенные палочки.

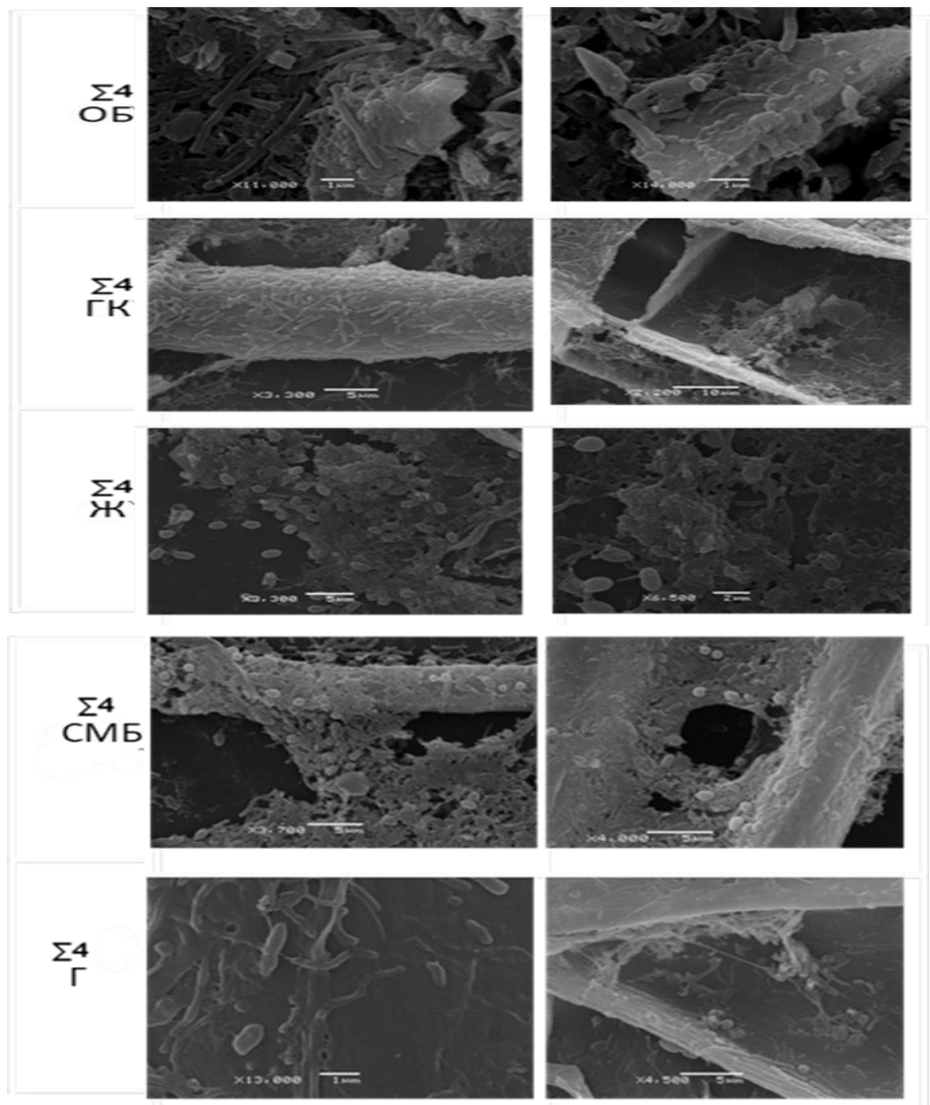


Рисунок 2. Термофильное анаэробное сообщество $\Sigma 4$ после 10 суток культивирования на разных типах бумаги: офисная бумага (ОБ), гофрированный картон (ГК), журнальная (Ж) и газетная (Г) бумаги, смесь бумаг (СМБ). СЭМ

Анализ состава доминирующих популяций бактерий и архей в МС

Для изучения разнообразия микроорганизмов, а также изменений в составе исследуемых термофильных целлюлозолитических МС, был проведен ДГГЭ анализ. Результаты данных ДГГЭ, сделанного на основе двухступенчатой ПЦР с использованием бактериальных праймеров

Bact907R и Univ515F, а затем Bact907R и Univ518F-GC представлен на рисунке 3А. Бактериальный профиль по ДГГЭ подтвердил результаты световой и электронной микроскопии: меньше всего микроорганизмов (количество полос) наблюдали в образцах сообществ, культивируемых на газетной и журнальной бумагах, тогда как максимальное разнообразие по численности и интенсивности полос было обнаружено при культивировании МС на офисной бумаге и смеси бумаг. При сравнении двух сообществ ($\Sigma 4$ и $\Sigma 7$), выращенных на смеси бумаг, ДГГЭ профиль сообщества $\Sigma 4$ был представлен большим разнообразием микроорганизмов (числом обнаруженных полос).

Результаты идентификации показали (таблица 1), что доминирующими в идентифицированных образцах являются представители *Firmicutes*, включая 5 различных родов: *Acetivibrio*, *Thermoanaerobacter*, *Defluviitalea*, *Tepidanaerobacter* и *Herbinex*, а также представители *Thermotogae* и *Bacteroidetes*. Одна из наиболее широких и ярких полос была идентифицирована как *Herbinex hemicellulosilytica* (полоса 105) и обнаруживалась только в образцах МС, культивируемых на картоне; более слабо она визуализировалась в МС, выращенных на смеси бумаг. *Petrimonas* sp. (соответствует полосе 103) также выявлялся крайне слабо на офисной бумаге, тогда как более отчетливо присутствовал в МС на смеси бумаг.

Вторую фореграмму ДГГЭ получали с помощью вложенной ПЦР, где первый фрагмент амплифицировали с помощью пары праймеров 63F - 1387R, а вторую амплификацию проводили с помощью праймеров Com1GC - Bact907R (рисунок 3В). В этом анализе доминирующие виды были идентифицированы, как наиболее близкие к *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Acetivibrio cellulolyticus* и *Tepidanaerobacter* sp. В отличие от первого профиля ДГГЭ, при анализе второй фореграммы общее микробное разнообразие (в соответствии с количеством полос) оказалось меньшим; кроме того, было выявлено некоторое количество неспецифических полос (например, 204 и 206, принадлежащие к *Acetivibrio cellulolyticus*).

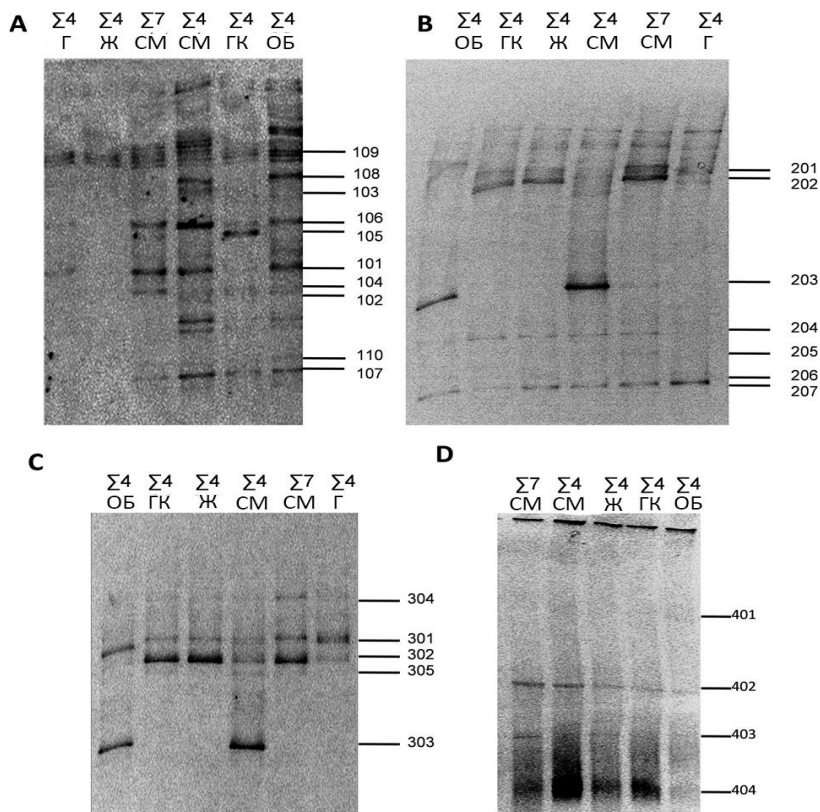


Рисунок 3. Бактериальные (А-С) и архейный (D) профили (foreграммы) ДГГЭ, полученные с помощью: набора праймеров Bact907R - Univ515F (A); вложенной (nested) ПЦР (B) (первая праймерная пара - 63F - 1387R, а вторая праймерная пара - Com1-GC - Bact907); одноступенчатой ПЦР (C) с использованием пары праймеров Com1-GC - Bact907R; набора праймеров Univ518F - Arch915R и Univ515F-GC-Arch915R (D). В качестве целлюлозосодержащих субстратов использовали: ОБ - офисная бумага, GK- гофрированный картон, Ж - журнальная бумага, CM - смесь бумаг и Г - газетная бумага. Полосы на foreграммах пронумерованы 101-111 (A); 201-207 (B); 301-305 (C); 401-408 (D)

Среди тестируемых субстратов только в образцах с офисной и журнальной бумагами был идентифицирован *Clostridium cellulosi* (полоса 203), который является активным целлюлозолитиком, выделяя десятки гликозидных гидролаз, принадлежащих к 15 различным семействам (Debowski et al., 2013).

В одноступенчатой ПЦР, проведённой с другой парой универсальных бактериальных праймеров Com1-GC и Bact907R с использованием РНФ-полимеразы[®] были получены результаты с минимальным (пять) разнообразием полос (рисунок 3C). Использование РНФ-полимеразы[®]

позволяет получить последовательности с 98-99% сходством и избежать появления неспецифических полос. Полученные результаты подтвердили, что наибольшее бактериальное разнообразие представлено в МС Σ4, культивируемом на смеси бумаг. Широкие полосы в профиле образцов МС, культивируемых на офисной бумаге и журнале (303 и 305), принадлежат к роду *Clostridium*, при этом полоса, идентифицированная как *Acetivibrio cellulolyticus* (302), обнаруживалась только в сообществе Σ4, культивируемом на картоне и журнальной бумаге. Как и во втором ДГЭ профиле (рисунок 3С), [*Clostridium*] *cellulosi* (303) был обнаружен помимо МС Σ4, культивируемого на офисной бумаге, только в МС на смеси бумаг, что указывает на тот факт, что при использовании смеси бумаг сохраняются ведущие доминирующие популяции, в том числе целлюлозолитических микроорганизмов, исходно преобладающих только на каком-то одном типе субстрата.

Таблица 1. Структура бактериальной компоненты целлюлозолитических термофильных микробных сообществ по данным ДГЭ анализа и последующего секвенирования 16S рРНК.

| Band ID - номер, депонированный в GenBank (NCBI) | Максимальная гомология, согласно NCBI | Гомология, % | Филум |
|--|---|--------------|----------------------|
| 101 - KY780546 | <i>Defluviitoga tunisiensis</i> AS22 16S (KT274708.1) | 95 | <i>Thermotogae</i> |
| 103 - KY780548 | Uncultured <i>Petrimonas</i> sp. clone B50-1 16S (KC555215.1) | 95 | <i>Bacteroidetes</i> |
| 104 - KY780549 | Uncultured <i>Thermotogae</i> bacterium (CU924187.1) | 88 | <i>Thermotogae</i> |
| 105 - KY780550 | <i>Herbinix hemicellulosilytica</i> T3/55T (LN626355.1) | 93 | <i>Firmicutes</i> |
| 107 - KY780552 | <i>Tepidanaerobacter</i> sp. AS46 (KT274715.1) | 96 | <i>Firmicutes</i> |
| 108 - KY780553 | <i>Defluviitalea</i> sp. GRX3 (LN881573.1) | 92 | <i>Firmicutes</i> |
| 109 - KY780554 | <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> HL-2 (KM036187.1) | 93 | <i>Firmicutes</i> |
| 110 - KY780555 | Uncultured <i>Thermoanaerobacteraceae</i> bacterium (KJ626484.1) | 91 | <i>Firmicutes</i> |
| 201 - KY780556 | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (NR_074419.1) | 99 | <i>Firmicutes</i> |
| 202 - KY780557 | <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> HL-2 (KM036187.1) | 98 | <i>Firmicutes</i> |
| 203 - KY780558 | [<i>Clostridium</i>] <i>cellulosi</i> , isolate DG5 (LN881577.1) | 98 | <i>Firmicutes</i> |
| 204 - KY780559 | <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> HL-2 (KM036187.1) | 96 | <i>Firmicutes</i> |
| 206 - KY780561 | <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> HL-2 (KM036187.1) | 96 | <i>Firmicutes</i> |
| 207 - KY780562 | <i>Tepidanaerobacter</i> sp. AS46 (KT274715.1) | 99 | <i>Firmicutes</i> |
| 301 - KY780563 | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain Gluc4 (KT274717.1) | 99 | <i>Firmicutes</i> |
| 302 - KY780564 | <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> HL-2 (KM036187.1) | 96 | <i>Firmicutes</i> |
| 303 - KY780565 | [<i>Clostridium</i>] <i>cellulosi</i> , isolate DG5 (LN881577.1) | 99 | <i>Firmicutes</i> |
| 304 - KY780566 | Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium (LN851753.1) | 90 | <i>Firmicutes</i> |
| 305 - KY780567 | <i>Clostridium</i> sp. 6-16 (FJ808609) | 98 | <i>Firmicutes</i> |

Сообщество, разлагающее газету, было представлено наименьшим разнообразием полос, из которых единственная была идентифицирована как *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Примечательно, что полосы, соответствующие этому микроорганизму, обнаруживаются на всех типах фореграмм (201, 301), что указывает на ведущую роль этого гидролитика в составе термофильных целлюлозолитических сообществ.

Другим важным обнаружением, как при DGGE, так и при HTS анализе, оказалось наличие представителей *Tepidanaerobacter* и *Thermotoga*, которые относят к группе синтрофных ацетат-окисляющих бактерий (SAOB). Они используют H_2/CO_2 для получения ацетата, который также могут обратимо потреблять (Hattori, 2008). Описаны ассоциации SAOB с гидрогенотрофными метаногенами: бактерии, относящиеся к родам *Thermotoga*, *Tepidanaerobacter*, *Thermoacetogenium*, *Syntrophaceticus* и *Acetobacterium* вступают во взаимодействие с археями *Methanoculleus* и/или *Methanothermobacter* (Hattori, 2008; Maus et al., 2016).

Состав архейной компоненты исследуемых МС представлен на рисунке 3D. Представители архей были идентифицированы как принадлежащие к родам *Methanoculleus* (401), *Methanothermobacter* (402, 403) и *Methanosarcina* (404). Все они принадлежат к филуму *Euryarchaeota*, среди них *Methanoculleus thermophilus* и *Methanothermobacter thermautotrophicus* (порядок *Methanobacteriales*) относят к гидрогенотрофным метаногенам, а *Methanosarcina thermophila* (порядок *Methanomicrobiales*) способна к переключению метаболизма с ацетокластического метаногенеза на гидрогенотрофный. Преобладание гидрогенотрофных архей, в частности *Methanothermobacter*, также выявленное при HTS анализе, подтверждает присутствие группы синтрофных ацетат-окисляющих бактерий (SAOB), тогда как водород используется для метаногенеза при биоконверсии в биогаз целлюлозосодержащих субстратов в термофильных условиях.

Анализ полученных последовательностей участка гена 16S рРНК позволяет заключить, что микроорганизмы, идентифицированные как *Tepidanaerobacter* и *Thermotoga*, являются синтрофными SAOB. Они также были обнаружены в качестве основных групп во время ДГГЭ анализа (полосы 107, 104) на фореграммах МС, которые культивировали на офисной бумаге, смеси бумаг и гофрированном картоне, тогда как они отсутствовали или были в следовом количестве на газетной и журнальной бумагах. Несмотря на присутствие целлюлозолитических бактерий в сообществе, отсутствие важной группы синтрофных (SAOB) бактерий объясняет плохую биоконверсию газетной и журнальной бумаг в биогаз. И наоборот, их наличие в метаногенных сообществах, в том числе их сохранность в МС, культивируемом на смеси бумаг, делает процесс биоконверсии ЦСС в термофильных условиях эффективным.

Выделение и идентификация чистых культур анаэробных целлюлозолитических бактерий

При выделении изолятов активных целлюлозолитиков из микробных сообществ ($\Sigma 4$ и $\Sigma 7$) на твердых агаризованных средах было получено 150 отдельных колоний. Для дальнейшей работы были выбраны четыре изолята, которые после пересевов в течение не менее трёх пассажей оставались однородными (при анализе с помощью световой микроскопии) и активными в отношении деградации целлюлозы. Им были присвоены номера И1, И2, И3 и И4.

При этом изоляты И1 (в меньшей степени), И2 и И4 в процессе роста и деградации субстрата образовывали желтый пигмент. Согласно литературным данным, это водонерастворимое соединение, названное «желтым афинным веществом» (от англ. yellow affinity substance), синтезируют целлюлозолитические штаммы *Clostridium thermocellum*, а также некоторые другие анаэробные целлюлозолитики, например, *Ruminococcus flavefaciens* (Копеску и Нодрова, 1997) при росте на целлюлозосодержащих субстратах. Таким образом, наличие этого пигментированного соединения может косвенно свидетельствовать о выделении культуры анаэробных целлюлозолитиков.

На следующем этапе работы было проведено секвенирование участка гена 16S рРНК (1534 п.о.) для каждого из четырех изолятов с использованием пары универсальных праймеров EUB1 и EUB2. Все выделенные изоляты показали наибольшее сходство с видом *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Типовым штаммом этого вида является *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 (De Vos et al., 2009). При полногеномном секвенировании данного штамма у него не было обнаружено наличия функционального гена β -глюкозидазы, необходимой для деструкции целлюлозы. Однако помимо типового штамма, к настоящему моменту описано несколько других штаммов этого вида, способных к деструкции целлюлозы, например, *T. thermosaccharolyticum* M5 (Jiang et al., 2017), *T. thermosaccharolyticum* M0795 (Shaw et al., 2010), *T. thermosaccharolyticum* TG57 (Li et al., 2018). Согласно полученным нами результатам, изоляты И2 и И3 имеют более 99% сходства именно со штаммами *T. thermosaccharolyticum* TG57 и *T. thermosaccharolyticum* M0795.

В то же время изоляты 1 и 3 на дендрограмме (рисунок 4) образуют отдельную ветвь и значение достоверности ветвления (bootstrap test) для данного узла составляет 100%, что подтверждает принадлежность изолятов 1 и 3 к роду *Thermoanaerobacterium*. Изолят 2, который имеет целлюлозолитическую активность, группируется в единый кластер со штаммом *T. thermosaccharolyticum* DSM 571, но они составляют отдельную неустойчивую ветвь при значении достоверности ветвления менее 70%. Несмотря на то что изоляты 1 и 3 имеют определенное сходство с

T. thermosaccharolyticum, они образуют отдельную ветвь, также не объединяющуюся и с другими видами этого же рода на примере *T. xylanolyticum* и *T. saccharolyticum*. Однако для выяснения филогенетической принадлежности выделенных изолятов требуются дальнейшие исследования, в том числе по функциональным генам, участвующим в разложении целлюлозы.

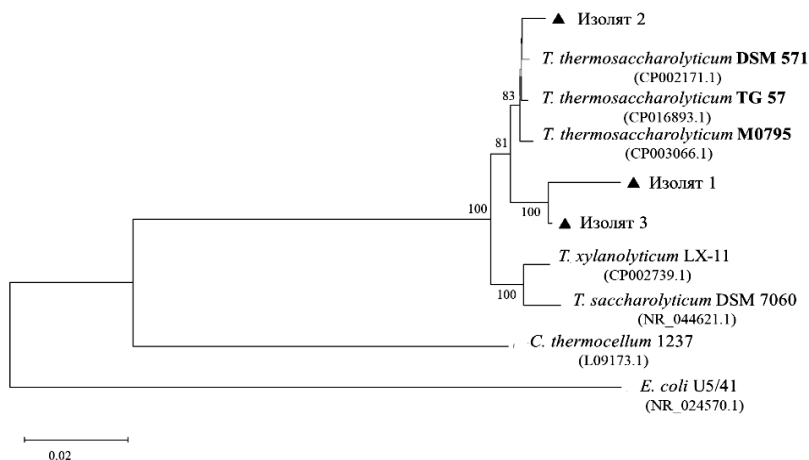


Рисунок 4. Дендрограмма, построенная на основании анализа множественного выравнивания исследуемых контигов и референсных последовательностей в программе MEGA X® с помощью метода neighbour-joining. В качестве реперных образцов использованы последовательности 16S rRNA целлюлозолитической клостридии *Clostridium thermocellum*, нескольких штаммов *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *T. xylanolyticum*, *T. saccharolyticum*, а также *E. coli*. Значимость разбиения на кластеры указана в цифрах, обозначающих достоверность ветвления согласно бутстреп (bootstrap) анализу (% от 1000 реплик)

Бинарно-последовательная ко-культура *Clostridium thermocellum* и *Clostridium acetobutylicum* для биоконверсии целлюлозы в бутанол

Другим распространенным типом биотоплива, а также органических растворителей являются АБЭ продукты (ацетон, бутанол, этанол) брожения некоторых видов клостридий. При биоконверсии трудноразлагаемых ЦСС в продукты ацетоно-бутилового брожения технология консолидированного биопроцессинга (КБ), при которой образование целлюлаз, гидролиз целлюлозы и сбраживание образующихся сахаров до конечных АБЭ-продуктов происходит в едином ферментёре, но осуществляется различными организмами, рассматривается как наиболее экономически эффективная технология. Однако в исследуемых нами условиях использование для этих целей микробных сообществ оказалось малоэффективным. Поэтому для конструирования бинарной ко-культуры

мы использовали модельный эксперимент с различными представителями клостридий: термофильной целлюлозолитической культурой *C. thermocellum* и мезофильной бутанол-образующей культурой *C. acetobutylicum*.

Эксперименты по бинарно-последовательному культивированию двух культур и биоконверсии целлюлозы в биобутанол проходят при различных температурных режимах, где первая фаза - это культивирование термофильной *C. thermocellum* при 60 °С для гидролиза целлюлозы, а вторая - ферментация сахаров мезофильной *C. acetobutylicum* с образованием продуктов АБЭ-брожения при 37°С. Накопление АБЭ-продуктов происходит на вторые-третьи сутки культивирования. Максимальное количество бутанола (2,9 г/л) и этанола (2,5 г/л) образуется в пробах с исходным количеством целлюлозы (фильтровальной бумаги) 20 г/л.

Сложность работы с клостридиальными бинарно-последовательными ко-культурами заключается в том, что они не могут быть описаны моделью классического двухфазного ацетоно-бутилового брожения (Yu et al., 1985; Nakayama et al., 2011). В исследуемой смешанной культуре перед внесением инокулята *C. acetobutylicum* pH доводили до значения 6,5; к пятым суткам культивирования pH снижается до 4,8-5,0. При этом образование нейтральных продуктов (ацетон, этанол и бутанол) происходит параллельно с накоплением кислот. Максимальные значения концентраций уксусной и масляной кислот составили 4,2 и 2,9 г/л соответственно, что не превышает их возможного ингибирующего значения.

После засева культурой *C. acetobutylicum* было обнаружено, что полного потребления имеющихся в среде сахаров не происходило ни в одном из трёх вариантов опыта с концентрациями субстрата 10, 15 или 20 г/л ФБ. Как одно из возможных решений увеличения выхода АБЭ-продуктов бинарных культур была исследована возможность дополнительной реинокуляции - повторного подсева культуры *C. acetobutylicum* после однократного подведения pH среды до значения 6,5. Через 24 ч после реинокуляции происходит увеличение выхода всех продуктов ферментации, однако, наибольшее увеличение наблюдали именно по содержанию бутанола в среде - в 1,4 раза по сравнению с выходом бутанола в культуре без реинокуляции, что составляет 70% от максимального теоретического выхода.

Одним из способов увеличения выхода АБЭ-продуктов является также использование рекомбинантных штаммов бактерий. Нами был выбран мутантный штамм *C. acetobutylicum* rex:int, у которого инактивирован ген SAC2713, кодирующий red-ox-чувствительный транскрипционный репрессор Rex, который регулирует экспрессию генов, ответственных за биосинтез бутанола, бутирил-КоА, этанола и лактата (Wietzke and

Bahl, 2012). Накопление нейтральных продуктов брожения происходило в этом случае раньше на сутки по сравнению с диким типом *C. acetobutylicum* 824, что также наблюдалось при классическом культивировании на глюкозе другими авторами (Wietzke and Bahl, 2012). Максимальное количество бутанола (2,9 г/л) и этанола (3,9 г/л) было отмечено в пробах с исходным количеством целлюлозы (ФБ) 20 г/л. На рисунке 5 представлен сравнительный анализ максимальных значений концентраций продуктов ацетоно-бутилового брожения для двух бинарных культур с использованием дикого и мутантного штаммов АБЭ-продуцента *C. acetobutylicum*.

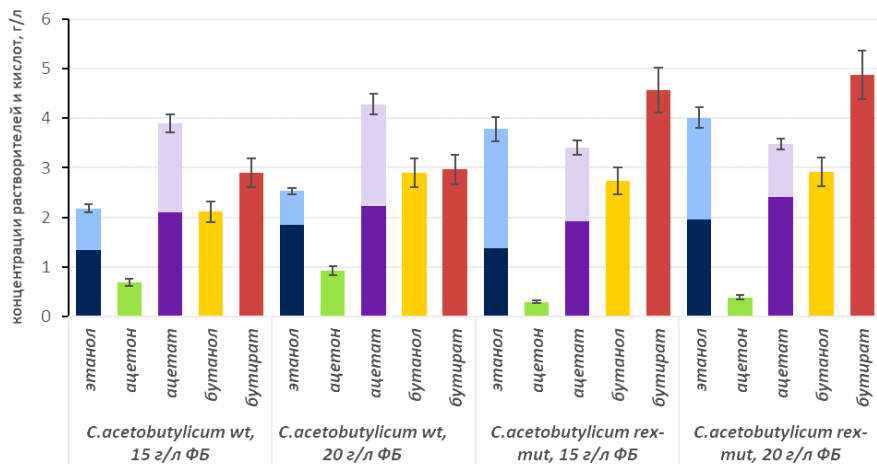


Рисунок 5. Максимальные значения концентраций АБЭ-продуктов, образованных при росте бинарно-последовательных культур на фильтровальной бумаге; wt - «wild type» - дикий тип *C. acetobutylicum* штамм 824; *C. acetobutylicum* rex:int - мутантный штамм. Для этанола и ацетата темным цветом обозначено количество продукта, образованного целлюлозолитической культурой *C. thermocellum* к моменту посева инокулята; светлым цветом обозначено количество этих веществ, образованное культурами *C. acetobutylicum*

По полученным нами для бинарной культуры данным выход этанола при использовании рекомбинантного штамма увеличился в 1,5 раза, а бутирата - в 1,6 раз, однако, содержание бутанола не изменилось. Суммарный выход АБЭ-продуктов *C. acetobutylicum* rex:int в нашем эксперименте составил 6,8 и 7,2 г/л при культивировании на 15 и 20 г/л ФБ соответственно, что на 39% и 18% превышает суммарный выход АБЭ-продуктов с использованием дикого типа *C. acetobutylicum*. При этом разница данных значений в основном представлена различием за счет количеств, образованных этанола и ацетона.

Заключение

В ходе проведённого нами комплексного исследования были изучены процессы биоразложения различных целлюлозосодержащих субстратов с образованием газообразного (биометан) и жидких (АБЭ продукты) видов биотоплива анаэробными микробными сообществами и смешанными культурами. В работе были использованы традиционные микробиологические методы по подбору и оптимизации условий культивирования микроорганизмов и комбинации их в ко-культуры, выбору субстратов и их сочетания, а также использованию ко-субстрата для более эффективной их биоконверсии. Изучение структуры микробных термофильных сообществ при помощи сканирующей электронной микроскопии позволило определить особенности адгезии, локализации и распределения микроорганизмов на используемых субстратах, а применение молекулярно-биологических методов - идентифицировать входящие в сообщество бактерии и археи.

Был изучен процесс биоконверсии в биогаз целлюлозосодержащих субстратов, среди которых различные типы бумаг, фитомасса растений и отходы пивного производства (дробина) с помощью метаногенных анаэробных сообществ. Эффективность подобных консорциумов определяется уникальным для каждого МС составом микроорганизмов и их трофическими взаимодействиями (Angelidaki et al., 2011; Цавкелова и Нетрусов, 2012). Было показано, что для получения более активных микробных консорциумов необходимо проведение предварительной селекции в течение нескольких пассажей на целлюлозосодержащем субстрате, в результате чего был осуществлен подбор эффективных МС, которые стабильно сохраняют свою активность на протяжении длительного времени. В качестве практического применения микробных консорциумов, показана возможность полной утилизации целлюлозосодержащих отходов на примере пивной дробины после её биоконверсии в биогаз в качестве биоудобрения.

Нами впервые был изучен состав целлюлозолитических термофильных метаногенных сообществ, культивируемых на различных типах бумаг, основными группами бактерий в которых являются *Bacteroidetes*, *Thermotogae* и *Firmicutes*, а метаногенами - преимущественно гидрогенотрофные представители *Methanoculleus* и *Methanothermobacter*, а также *Methanosarcina*. Была выявлена существенная роль особой группы термофильных синтрофных ацетат-окисляющих бактерий (SAOB), активно выводящих образующийся ацетат из трофической цепи, что определяет протекание гидрогенотрофного метаногенеза в этих условиях.

Как правило, целлюлозосодержащие субстраты не состоят только из 100% целлюлозы, а содержат также гемицеллюлозы и лигнин. Чтобы увеличить выход биотоплива при конверсии данных субстратов применяют

разнообразные технологии предобработки субстрата. Был изучен потенциал биологической предобработки лигноцеллюлозных субстратов с помощью *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus*, изучены возможности совмещения аэробного (с помощью грибов) и анаэробного (с помощью метаногенных сообществ) типов биоразложения субстратов. Отмечено эффективное использование смеси бумаж, содержащей легко- и трудноразлагаемые материалы, что в целом повышает их общую биodeградебельность и конверсию в биогаз.

Селекция микробных сообществ позволила выделить чистые культуры анаэробных термофильных бактерий-целлюлозодеструкторов, принадлежащих к *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, что для этого вида установлено впервые.

В работе также был применен метод использования бинарно-последовательного ко-культивирования микроорганизмов для получения АБЭ-продуктов. Ко-культура термофильного целлюлозолитика *C. thermocellum* и мезофильной бутанол-образующей клостридии *C. acetobutylicum* показала высокий выход нейтральных продуктов брожения по сравнению с известными к настоящему моменту литературными данными (Yu et al., 1985; Nakayama et al., 2011). Впервые в составе смешанной культуры был использован рекомбинантный штамм *C. acetobutylicum* rex:int, при этом выход этанола по сравнению с диким типом увеличился в 1,5 раза, а общий выход АБЭ-продуктов - в 1,2 раза. Для повышения выхода бутанола было впервые предложено проведение реинокуляции культурой *C. acetobutylicum*, что позволило получить 70% от максимального теоретического выхода бутанола.

Таким образом, в работе рассмотрены различные фундаментальные и прикладные аспекты использования микробных сообществ и ко-культур для получения биотоплива и утилизации трудноразлагаемых целлюлозосодержащих субстратов и отходов.

Выводы

1. Термофильные микробные сообщества показали свою эффективность при утилизации и биоконверсии в биогаз ряда целлюлозосодержащих субстратов на примере бумажной продукции и пивной дробины с содержанием до 62% и 59% метана соответственно.
2. Биологическая предобработка лигноцеллюлозных субстратов (на примере фитомассы топинамбура) с помощью культуры *Trichoderma viride* позволяет увеличить выход биогаза метаногенным микробным сообществом в 1,5 раза.
3. Впервые изучен состав термофильных микробных сообществ, образующих метан при культивировании на различных типах бумажной продукции: выявлены доминирующие популяции целлюлозолитических бактерий (*[Clostridium] cellulosi*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Herbinex hemicellulosilytica*), в том числе получено несколько изолятов *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Метаногены представлены преимущественно гидрогенотрофными археями (*Methanoculleus*, *Methanothermobacter*).
4. Показано присутствие синтрофных ацетат-окисляющих бактерий (*Tepidanaerobacter*, *Thermotoga*) и установлена их роль в осуществлении эффективной биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов термофильными (55°C) метаногенными сообществами.
5. На примере биоразложения фильтровальной бумаги впервые изучена потенциальная возможность использования клостридий (*Clostridium thermocellum* и *C. acetobutylicum*) при их бинарно-последовательном культивировании для получения продуктов ацетоно-бутилового брожения. Применение методики повторной инокуляции *C. acetobutylicum* позволило увеличить выход бутанола на 38% (с 2,9 г/л до 4 г/л). Использование нокаут-мутанта *C. acetobutylicum* *rex::int* повысило суммарный выход АБЭ-продуктов по сравнению с диким типом на 26%.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI:

- 1) Malakhova D.V., Egorova M.A., Prokudina (Popova) L.I., Netrusov A.I., Tsavkelova E.A. The biotransformation of brewer's spent grain into biogas by anaerobic microbial communities. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. - 2015. - Т. 31. - №. 12. - С. 2015-2023. DOI: 10.1007/s11274-015-1951-x. Импакт-фактор: 2,652.
- 2) Прокудина (Попова) Л.И., Осмоловский А.А., Егорова М.А., Нетрусов А.И., Цавкелова Е.А. Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов микромицетами с последующей биооконверсией в биогаз. // Прикладная биохимия и микробиология. - 2016. - Т. 52, № 2. - С. 200-209. Импакт-фактор РИНЦ: 1,048.
- 3) Tsavkelova E., Prokudina (Popova) L., Egorova M., Leontieva M., Malakhova D., Netrusov A. The structure of the anaerobic thermophilic microbial community for the bioconversion of the cellulose-containing substrates into biogas. // Process Biochemistry. - 2017. - Т. 66. - С. 183-196. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.12.006. Импакт-фактор: 2,883.

Тезисы докладов:

- 1) Прокудина (Попова) Л.И., Осмоловский А.А., Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И. Микробное разложение целлюлозосодержащих субстратов // Сборник тезисов Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» - 2014. - МАКС Пресс, Москва. - С. 190.
- 2) Прокудина (Попова) Л.И., Егорова М.А., Малахова Д.В., Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И. Биооконверсия целлюлозосодержащих субстратов в биотопливо // Сборник тезисов 1-ый Российский Микробиологический конгресс - 2017. - Москва. - С. 168-169.
- 3) Prokudina (Popova) L., Tsavkelova E., Bahl H., Netrusov A. Treatment of the cellulose-containing substrates by micromycetes and anaerobic microbial communities // Abstractbook of the Microbiology and Infection 2017 5th Joint Conference of the DGHM&VAAM - 2017. - Вюрцбург, Германия - С. 158.

