

УДК 579.85:573.6:579.222:579.63

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ АНАЭРОБНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, РАЗЛАГАЮЩИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗУ С ОБРАЗОВАНИЕМ МЕТАНА (БИОГАЗА)

Е.А. Цавкелова, М.А. Егорова, Е.В. Петрова, А.И. Нетрусов

(кафедра микробиологии; e-mail: tsavkelova@mail.ru)

Работа посвящена поиску активных анаэробных микробных сообществ, образующих биогаз при разложении целлюлозы в термофильных условиях (+55°C). Было исследовано 24 различных образца из природных и антропогенных источников, содержащих искомые микроорганизмы. С целью оптимизации условий культивирования была подобрана питательная среда для роста и селекции целлюлозолитических и метаногенных микроорганизмов. В процессе изучения динамики образования биогаза были отобраны наиболее продуктивные сообщества, которые сохраняли активность на протяжении пяти пассажей. Состав биогаза (метан, углекислый газ, водород) исследовали с помощью газовой хроматографии. В целом содержание метана в газовой смеси достигало 60%. Микроскопические исследования сообществ показали наличие различных морфотипов микробных клеток, соотношение которых изменялось по мере стабилизации сообществ. Обсуждается значимость проводимых исследований по трансформации целлюлозы в биогаз.

Ключевые слова: биогаз, метан, целлюлоза, анаэробные микробные сообщества, термофильные условия.

Сокращение запасов традиционных источников энергии (нефти, угля, газа и горючих сланцев), экологические катастрофы, связанные с их добычей и транспортировкой, приводящие к глобальным нарушениям в балансе экосистемы, а также к чрезмерному расходованию финансовых средств на исправление допущенных ошибок, определили поиски и разработку современных биотехнологических процессов, ориентированных на альтернативные возобновляемые сырьевые и энергетические источники [1–3]. В биоэнергетике используется прежде всего топливо, полученное на основе трансформации ряда органических субстратов биологического происхождения: продукции и отходов лесопользования и лесопереработки, отходов сельского хозяйства и животноводства, различных видов органических бытовых и промышленных отходов [4–7]. Так, получение возобновляемого источника энергии — биогаза (биометана) посредством анаэробной микробной ферментации признано одним из самых энергетически эффективных и экологически безопасных путей производства биотоплива. Биогаз состоит в основном из метана (55–80% CH₄) и двуокиси углерода (20–45% CO₂) с некоторыми следовыми количествами водорода и сероводорода и незначительным содержанием аммиака, азота, ароматических и галогенно-ароматических углеводородов [8–11]. В зависимости от содержания метана теплотворная способность биогаза составляет 4700–6000 ккал/м³ [12].

Однако, несмотря на то что реализация метановой энергетики становится в наше время все более

актуальной, потенциал таких производств не используется достаточно широко [13]. Это связано в первую очередь с тем, что микробиологические процессы, происходящие в таких микробных сообществах, достаточно сложны и требуют подробного изучения и более полного понимания. Чаще всего биогазовые установки работают на отходах животноводческих и сельскохозяйственных производств, а также на органических веществах сточных вод [14–18]. Целью настоящей работы было изучение возможности получения биогаза термофильными (активно функционирующими при температуре +55°C) сообществами анаэробных микроорганизмов, осуществляющими конверсию целлюлозы в CH₄ и CO₂. Основной задачей исследования был поиск активных микробных сообществ, выделенных из ряда природных экониш, и оценка их способности к стабильной продукции биогаза из целлюлозы.

Материалы и методы исследования

Культивирование накопительных культур с целью выделения активных сообществ микроорганизмов — продуцентов биогаза проводили на среде следующего состава (г/л): K₂HPO₄ — 1,0; KH₂PO₄ — 1,0; NH₄Cl — 2,5; MgSO₄ · 7H₂O — 0,5; CaCl₂ · 6H₂O — 0,1; NaCl — 0,1; CaCO₃ — 1,0; NaHCO₃ — 5,0; дрожжевой экстракт — 2,0; пептон — 1,0; раствор микроэлементов — 1 мл; резазурин — 0,5 мг/л; вода дистиллированная — 1000 мл; pH = 7,0–7,5. Раствор микроэлементов содержал (мг/л): ZnCl₂ — 70,0;

MnCl₂ · 4H₂O — 100,0; CoCl₂ · 6H₂O — 190,0; H₃BO₃ — 6,0; Na₂MoO₄ · 2H₂O — 36,0; CuCl₂ · 2H₂O — 2,0; NiCl₂ · 6H₂O — 24,0; Na₂WO₄ · 2H₂O — 15,0; FeSO₄ · 7H₂O — 1,0 г/л. Сульфат железа предварительно растворяли в 10 мл 25% HCl; вода дистиллированная — 990 мл. В качестве субстрата использовали целлюлозу (фильтры обеззоленные МРТУ 6-06-2411-65) в количестве 15 г/л среды. Предварительно целлюлозу нарезают на кусочки 0,5 см².

Для выделения микробных сообществ был произведен отбор образцов проб из различных экологических природных и антропогенных ниш (табл. 1). Посевной материал (30% от общего объема среды) вносили в 30 мл питательной среды, содержащейся во флаконах на 100 мл. Флаконы герметично закрывали резиновой пробкой, закатывали алюминиевым колпачком и заменяли воздушную газовую фазу на Ar. Культуры инкубировали в темноте при температуре 55°C (термофильные условия) в термостате (Binder BD 115, Германия). Хранение культур осуществляли в 25%-м глицероле в анаэробных условиях при -20°C.

Активность микробного сообщества определяли по приросту метана в газовой фазе и по степени деструкции субстрата. При максимально возможном разложении субстрата и окончании образования газообразных продуктов во флаконах осуществляли пересев культур в свежую среду. Продукты культивирования

определяли с помощью методов хроматографии. Стабильность выбранных сообществ проверяли путем неоднократных пересевов на свежую питательную среду с сохранением исходных параметров биологической активности. Определение концентраций CH₄, CO₂ и H₂ осуществляли методом газовой хроматографии на хроматографе Кристалл 2000 М (Хроматэк, РФ), оснащенном микрокапиллярной колонкой FFIP (15 000 × 0,5 мм), газ-носитель — аргон, расход 15 мл/мин, детектор — 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).

Активность газообразования оценивали, изменяя избыточное давление в герметично закрытых флаконах с культивируемым сообществом. Концентрацию индивидуального газа в смеси определяли по формуле:

$$A = (\sum V_{\text{газа}} / \sum V_{\text{смеси}}) \cdot 100,$$

где $\sum V_{\text{газа}}$ — суммарный объем индивидуального газа, определяемый с учетом потерь при отборе проб для хроматографического определения состава газовой смеси, $\sum V_{\text{смеси}}$ — суммарный объем смеси газов, образовавшихся за период культивирования, также с учетом потерь.

$V_{\text{газа}}$ при нормальных условиях ($p = 1 \text{ атм}$, $t = 273,15 \text{ К} = 0^\circ\text{C}$) определяли, используя уравнение состояния идеального газа — уравнение Клапейрона—Менделеева, устанавливающее зависимость между давлением, молярным объемом и абсолютной температурой идеального газа. В случае постоянной массы газа уравнение можно записать в виде $p \cdot V/T = \text{const}$.

$$V_{\text{газа}} = (p \cdot V_{\text{ф}} \cdot T_{\text{ну}} \cdot a) / (p_{\text{ну}} \cdot T \cdot 100),$$

где a — концентрация газа, измеренная на хроматографе (%), p — давление во флаконе (бар), $p_{\text{ну}}$ — давление при нормальных условиях, T — температура культивирования, $T_{\text{ну}}$ — температура при нормальных условиях, $V_{\text{ф}}$ — объем газовой фазы во флаконе с культивируемым сообществом. Используя следствие из закона Авогадро (при нормальных условиях один моль любого газа занимает объем, равный 22,4 л), можно определить количество вещества (моли) синтезированного газа $v = V_{\text{газа}} / 22,4$.

Для наблюдения за составом микробных сообществ и изменениями, происходящими в процессе культивирования микроорганизмов, также использовали оптический микроскоп Nikon Eclipse E100 с фотонасадкой DS-Fil (Nikon, Германия). Для этого готовили фиксированные окрашенные препараты сообществ: аликвоту в 100 мкл отбирали стерильным шприцем, наносили на площадь 1,5 см² предметного стекла, высушивали, термически фиксировали

Таблица 1

Источники посевного материала

№	Названия места (источника) отбора проб
1	Компостная куча № 1 (Московская обл.)
2	Компостная куча № 2 (Московская обл.)
3	Жом красного винограда (Дагестан)
4	Жом белого винограда (Дагестан)
5	Помет кролика (Московская обл.)
6	Навоз крупного рогатого скота (КРС) № 1 (Московская обл.)
7	Навоз КРС № 2 (Московская обл.)
8	Пробы из пресноводных термофильных водоемов (ППТВ) Камчатки № 21
9	ППТВ Камчатки № 23
10	ППТВ Камчатки № 20
11	ППТВ Камчатки № 22
12	ППТВ Камчатки № 19
13	ППТВ Камчатки № 17
14	Иловые отложения № 1 (Тверская обл.)
15	Донные осадки пруда № 1 (Тверская обл.)
16	Иловые отложения № 2 (Тверская обл.)
17	Донные осадки пруда № 2 (Тверская обл.)
18	Иловые отложения № 3 (Тверская обл.)
19	Навоз зебры (Зоопарк, Москва)
20	Навоз пони (Зоопарк, Москва)
21	Навоз антилопы гну (Зоопарк, Москва)
22	Навоз черной антилопы (Зоопарк, Москва)
23	Навоз слона (Зоопарк, Москва)
24	Копролиты дождевых червей (Ботанический сад, Москва)

и окрашивали водным раствором фуксина в течение 3 мин. Препараты рассматривали под иммерсионным маслом при увеличении $\times 900$. Все эксперименты проводили в трех—пяти повторностях.

Результаты и обсуждение

Основной особенностью анаэробного превращения целлюлозы в метан является сложная структура участвующих в таких превращениях микробных сообществ, складывающаяся в своеобразную “пищевую цепь”. Микробные популяции, анаэробно преобразующие целлюлозу в метан, таксономически разнообразны, различаются в психрофильных, мезофильных и термофильных местообитаниях, однако проводят в основном одни и те же реакции [19—21]. Тесные взаимоотношения внутри микробного сообщества базируются прежде всего на пищевых потребностях, складывающихся внутри цепи, когда продукты одних процессов становятся субстратами для других без значительного накопления промежуточных соединений, часто являющихся токсичными даже для организмов, их потребляющих, если их концентрации превысят критические [22]. При разложении целлюлозы после действия гидролитиков и бродильщиков среди основных продуктов обнаруживаются летучие жирные кислоты (ЛЖК), спирты, водород и углекислый газ, синтрофные бактерии способны превращать ЛЖК и спирты в ацетат, CO_2 и H_2 . На заключительном этапе метаногены из этих продуктов образуют биогаз. При этом быстрое и беспрепятственное протекание общего процесса зависит от эффективного удаления образующегося на первой стадии водорода гидрогенотрофными метаногенами — единственными организмами системы, способными анаэробно удалять водород для восстановления CO_2 в метан.

Для выделения активных сообществ микроорганизмов, образующих биогаз, нами были проведены эксперименты по подбору оптимальной среды культивирования анаэробных микробных консорциумов. Также учитывали тот факт, что выбранная среда не должна содержать дорогостоящих компонентов и быть оптимальной для культивирования микроорганизмов, выделенных из различных экологических ниш. Для этого были проанализированы несколько типов питательных сред известного состава, используемых для выделения и культивирования анаэробных целлюлозолитиков и метаногенов [23—26]. Таким образом, в качестве универсальной питательной среды была разработана модифицированная среда, которая удовлетворяла бы потребностям всех основных групп микроорганизмов, осуществляющих процесс превращения целлюлозы в метан: гидролитиков, синтрофов и метаногенов. Для культивирования сообществ были выбраны термофильные условия с температурой $+55^\circ\text{C}$, так как известно, что преимуществами такого процесса помимо образования биогаза являются более полный

гидролиз субстрата, относительно незначительное образование микробной биомассы, которую можно затем использовать для удобрений, а также возможность санитарной обработки материала (уничтожение патогенных микроорганизмов и личинок гельминтов), [3, 27—31].

Селекцию и выделение микробных сообществ, образующих максимальное количество метана, проводили на основе оценки концентрации метаболитов (метан, углекислый газ) с помощью газовой хроматографии. Немаловажным фактором в биотехнологии является стабильная активность работающих сообществ микроорганизмов. Поэтому каждое отобранное сообщество проверяли на сохранение исходных параметров выхода биогаза в течение нескольких пересевов. Поскольку процесс метаногенеза является заключительным в цепочке превращений органического сырья под воздействием биологической деструкции микроорганизмов, для полного исследования процессов, происходящих в выбранном сообществе, в ряде случаев требовалось не менее 25 сут культивирования в течение одного пассажа (рис. 1, 2). Из 24 исследованных культур были отобраны наиболее продуктивные сообщества, которые были использованы для последующих пересевов (табл. 1).

В основном сообщества, успешно трансформирующие целлюлозу в биогаз, были выделены из навоза травоядных животных. Выбранные анаэробные микробные сообщества отличались высокой эффективностью конверсии целлюлозы в метан (в среднем около $15 \text{ ммоль CH}_4/\text{г}$ субстрата) и отличались устойчивым образованием биогаза на протяжении 5 пересевов (более полугодя культивирования). По мере

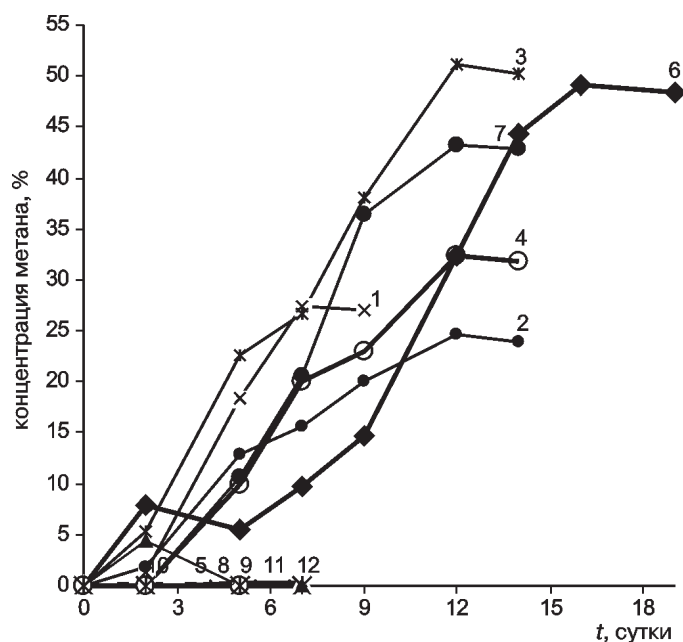


Рис. 1. Динамика образования метана сообществами № 1—12 (1-й пассаж), выращенных в термофильных условиях. Данные представлены средним арифметическим из 3—5 повторностей; вариабельность значений внутри эксперимента не превышала 10%

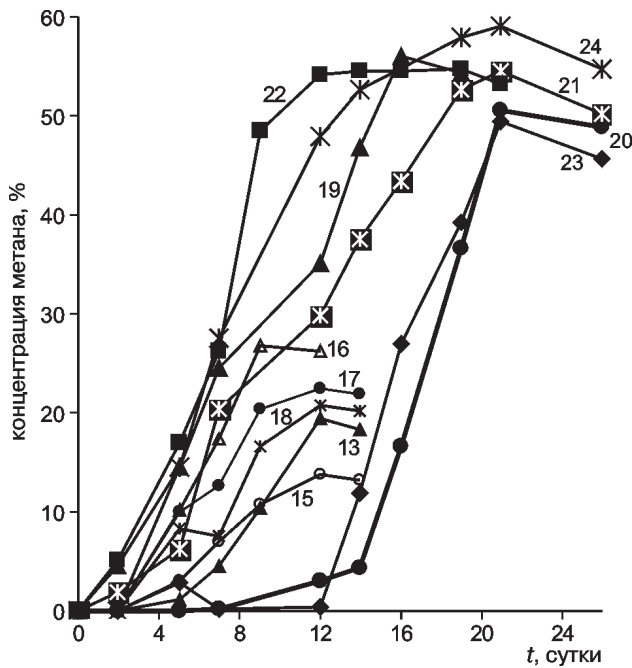


Рис. 2. Динамика образования метана сообществами № 13–24 (1-й пассаж), выращенных в термофильных условиях. Данные представлены средним арифметическим из 3–5 повторностей; вариабельность значений внутри эксперимента не превышала 10%

стабилизации большинства сообществ происходило увеличение продукции CH_4 в составе биогаза (табл. 2). Сообщества № 1, 2 и 16, которые показали незначительное усиление образования биогаза после второго пересева, далее не изучались. На протяжении всего исследования культуры № 23 и № 24 достигали своего конечного значения по выходу метана не ранее, чем через 36–40 дней культивирования (данные не представлены), в то время как другие исследованные сообщества более активно потребляли субстрат и переводили его в метан за 18–25 сут. В целом в процессе культивирования на модифицированной среде с источником углерода — целлюлозой — сообщества вырабатывали до 60% метана, что удовлетворяет современным требованиям по микробной продукции биогаза. При этом содержащийся в газовой смеси углекислый газ, имеющий биологическое происхождение, также может найти применение в пищевой промышленности (для выработки сухого льда или газирования напитков). Содержание водорода на конец культивирования не превышало десятых долей процента, а в подавляющем большинстве образцов равнялось нулю, что свидетельствует о сбалансированном процессе анаэробного превра-

Таблица 2

Сводные данные по образованию метана микробными сообществами

№ пробы		1-й пассаж	2-й пассаж	3-й пассаж	4-й пассаж	5-й пассаж
1	CH_4 (суммарное содержание, %)	27,5	38,8	—	—	—
	ммоль CH_4 /л среды	41,2	73,4			
	ммоль CH_4 /г целлюлозы	2,7	4,9			
2	CH_4 (суммарное содержание, %)	24,7	41,8	—	—	—
	ммоль CH_4 /л среды	36,8	46,5			
	ммоль CH_4 /г целлюлозы	2,4	3,1			
3	CH_4 (суммарное содержание, %)	51,1	39,6	59,7	56,7	53,5
	ммоль CH_4 /л среды	124,9	75,2	249,9	221,6	248,6
	ммоль CH_4 /г целлюлозы	8,3	5,0	16,7	14,8	16,6
4	CH_4 (суммарное содержание, %)	32,4	47,0	34,3	61,5	47,5
	ммоль CH_4 /л среды	47,3	153,2	60,3	205,4	158,2
	ммоль CH_4 /г целлюлозы	3,1	10,2	4,0	13,7	10,5
6	CH_4 (суммарное содержание, %)	49,2	51,3	56,6	56,1	56,3
	ммоль CH_4 /л среды	219,2	180,7	175,9	128,4	246,3
	ммоль CH_4 /г целлюлозы	14,6	12,0	11,7	8,6	16,4
7	CH_4 (суммарное содержание, %)	43,3	35,2	32,5	59,8	53,9
	ммоль CH_4 /л среды	69,4	74,9	67,8	237,2	22,9
	ммоль CH_4 /г целлюлозы	4,6	5,0	4,5	15,8	16,2
16	CH_4 (суммарное содержание, %)	26,8	31,0	—	—	—
	ммоль CH_4 /л среды	14,7	86,3			
	ммоль CH_4 /г целлюлозы	1,0	5,7			

Окончание табл. 2

№ пробы		1-й пассаж	2-й пассаж	3-й пассаж	4-й пассаж	5-й пассаж
17	CH ₄ (суммарное содержание, %)	22,5	50,8	52,5	50,1	54,3
	ммольCH ₄ /л среды	24,8	187,1	159,4	133,5	271,7
	ммольCH ₄ /г целлюлозы	1,6	12,5	10,6	8,9	18,2
18	CH ₄ (суммарное содержание, %)	20,7	43,8	59,4	55,2	54,0
	ммольCH ₄ /л среды	17,1	84,7	247,9	230,7	247,3
	ммольCH ₄ /г целлюлозы	1,1	5,6	16,5	15,4	16,5
19	CH ₄ (суммарное содержание, %)	56,1	53,9	55,9	52,9	56,1
	ммольCH ₄ /л среды	288,1	256,3	247,5	222,7	172,6
	ммольCH ₄ /г целлюлозы	19,2	17,1	16,5	14,8	11,5
20	CH ₄ (суммарное содержание, %)	50,7	59,9	57,2	53,2	51,9
	ммольCH ₄ /л среды	241,8	229,7	258,2	225,9	167,9
	ммольCH ₄ /г целлюлозы	16,1	15,3	17,2	15,1	11,2
21	CH ₄ (суммарное содержание, %)	54,5	59,0	55,2	53,6	58,4
	ммольCH ₄ /л среды	225,4	258,2	270,3	213,8	233,8
	ммольCH ₄ /г целлюлозы	15,0	17,2	18,0	14,2	15,6
22	CH ₄ (суммарное содержание, %)	54,8	53,7	53,9	61,5	56,6
	ммольCH ₄ /л среды	340,1	251,9	237,3	215,7	200,5
	ммольCH ₄ /г целлюлозы	22,7	16,8	15,8	14,4	13,4
23	CH ₄ (суммарное содержание, %)	49,3	61,5	55,9	52,6	—
	ммольCH ₄ /л среды	206,5	209,6	263,9	252,8	
	ммольCH ₄ /г целлюлозы	13,8	13,9	17,6	16,9	
24	CH ₄ (суммарное содержание, %)	59,0	57,9	54,5	47,6	—
	ммольCH ₄ /л среды	312,6	193,5	213,9	259,3	
	ммольCH ₄ /г целлюлозы	20,8	12,9	14,3	17,3	

Примечание. Данные представлены средним арифметическим из 3–5 повторностей; варибельность значений внутри эксперимента не превышала 5–10%.

шения углерода в метан и активной работе синтрофных микроорганизмов. Хотя целлюлоза и гемицеллюлоза являются основными компонентами растительной биомассы, которые подвергаются микробной трансформации в метан, получение биогаза с высокой эффективностью из этих субстратов представляется затруднительным [32], поскольку исходное растительное сырье необходимо подвергнуть предварительной обработке для того, чтобы сделать его доступным для микробного разложения. В то же время бумага и картон, которые составляют большую часть городских твердых отходов, являются хорошим материалом, подвергающимся биодegradации [33]. При этом анаэробные способы переработки более предпочтительны, так как компостирование характеризуется очень длительным периодом биорасщепления.

Различия в составе микробных сообществ как между культурами, выделенными из различных источников, так и между начальными и конечными

этапами (пассажами) селекции сообществ были зафиксированы при микроскопическом исследовании препаратов (рис. 3, 4). Так, микроорганизмы представлены различными формами: короткими и длинными палочками, кокками, микроорганизмами неправильной формы (изогнутыми формами), большим количеством спор (преимущественно клостридиального типа спороношения), что свидетельствует о присутствии *Clostridium* spp., которые являются известными активными целлюлозолитиками и играют одну из главенствующих ролей в анаэробном разложении целлюлозы. Известно, что метаногенное сообщество — это типичный пример синтрофизма, где партнеры почти полностью зависят друг от друга [15]. Такие консорциумы могут включать в себя до 60 различных видов бактерий и архей, развивающихся в анаэробных условиях, чье взаимодействие основывается на трофической взаимосвязи, обмене факторами роста, воздействии физиологически активных веществ [22, 34].

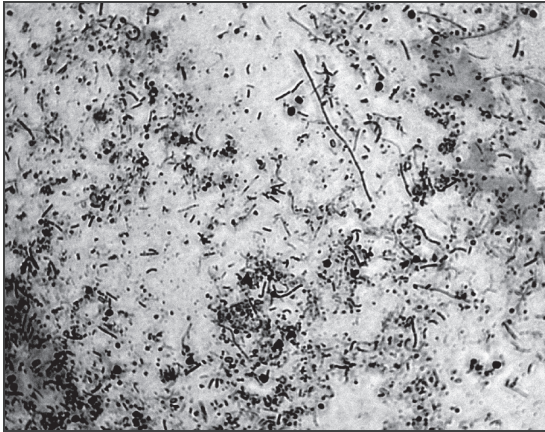


Рис. 3. Анаэробное сообщество № 3 (4-й пассаж). Разнообразие морфотипов микробных клеток, входящих в сообщество

Таким образом, в данной работе был проведен скрининг и отобраны термофильные анаэробные микробные сообщества, способные разлагать целлюлозу с образованием биогаза; была подобрана оптимальная среда культивирования; после определения наиболее эффективных сообществ — продуцентов метана были отобраны наиболее стабильные консорциумы, сохраняющие активность в течение более 6 мес. Микроскопические исследования позволили обнаружить разнообразие микроорганизмов, входящих в эти сообщества. Планируется дальнейшее изучение и идентификация входящих в исследуемые сообщества микроорганизмов с применением методов DGGE для

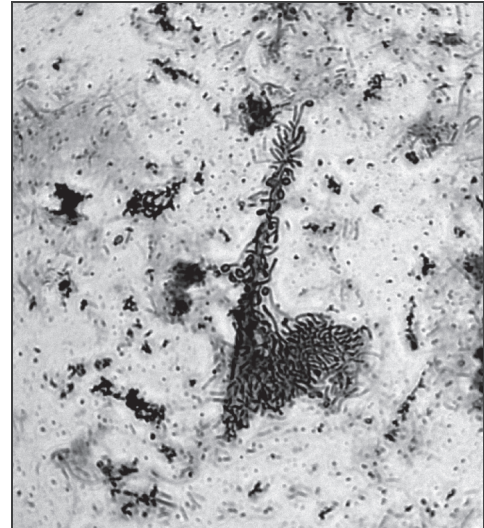


Рис. 4. Анаэробное сообщество № 4 (1-й пассаж). Микробные клетки (в том числе с терминальными спорами), объединяющиеся вокруг волокна целлюлозы

определение вклада каждого участника сообщества в разложение целлюлозы с образованием метана.

* * *

Авторы выражают благодарность за предоставление гранта ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009—2013 годы; ГК № П2470.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abelson H.P.* Renewable liquid fuels // *Science*. 1995. Vol. 268. P. 955.
2. *Claassen P.A.M., de Vrije T.* Non-thermal production of pure hydrogen from biomass: HYVOLUTION // *Int. J. Hydrogen Energy*. 2006. Vol. 31. P. 1416—1423.
3. *Boerjesson P., Mattiasson B.* Biogas as a resource-efficient vehicle fuel // *Trends Biotechnol.* 2008. Vol. 26. P. 7—13.
4. *Калюжный С.В., Данилович Д.А., Ножевникова А.Н.* Анаэробная биологическая очистка сточных вод // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология*. 1991. Т. 29. 156 с.
5. *Ножевникова А.Н., Лебедев В.С., Заварзин Г.А., Иванов Д.В., Некрасова В.К., Лифшиц А.В.* Образование, окисление и эмиссия биогаза на объектах захоронения бытовых отходов // *Журн. общ. биол.* 1993. № 4. С. 168—183.
6. *Hall D.O., Scrase J.I.* Will biomass be the environmentally friendly fuel of the future? // *Biomass and Bioenergy*. 1998. Vol. 15. № 4. P. 357—367.
7. *Rice W.* Hydrogen production from methane hydrate with sequestering of carbon dioxide // *Int. J. Hydrogen Energy*. 2006. Vol. 31. P. 1955—1963.
8. *Калюжный С.В., Пузанков А.Г., Варфоломеев С.Д.* Биогаз: проблемы и решения // *Итоги науки и техники. Биотехнология*. 1988. Т. 21. 177 с.
9. *Kapdi S.S., Vijay V.K., Rajesh S.K., Prasad R.* Biogas scrubbing, compression and storage: perspective and prospectus in Indian context // *Renew. Energy*. 2005. Vol. 30. P. 1195—1202.
10. *Василов П.Г.* Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 3: биогаз // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2007. Т. 3. № 3. С. 54—61.
11. *Vindis P., Mursec B., Rozman C., Janzekovic M., Cus F.* Mini digester and biogas production from plant biomass // *J. Achiev. Mater. Manuf. Eng.* 2009. Vol. 35. P. 191—196.
12. *Angelidaki I., Ahring B.K.* Thermophilic anaerobic digestion of livestock wastes: the effect of ammonia // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993. Vol. 38. P. 560—564.
13. *Lübken M., Gehring T., Wichern M.* Microbiological fermentation of lignocellulosic biomass: current state and prospects of mathematical modeling // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 85. P. 1643—1652.
14. *Pillay V.L., Townsen B., Buckley C.A.* Improving the performance of anaerobic digesters at wastewater treatment works: The coupled cross-flow microfiltration/digester process // *Wat. Sci. Techn.* 1994. Vol. 30. P. 329—337.
15. *Schink B.* Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997. Vol. 61. P. 262—280.
16. *Chan A.S.K., Parkin T.B.* Methane oxidation and production activity in soils from natural and agricultural ecosystems // *J. Environ. Qual.* 2001. Vol. 30. P. 1896—1903.
17. *Ueno Y., Sasaki D., Fukui H., Haruta S., Ishii M., Igarashi Y.* Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by

thermophilic anaerobic microflora // J. Appl. Microbiol. 2006. Vol. 101. P. 331–343.

18. Farhadian M., Borghei M., Umrana V.V. Treatment of beet sugar wastewater by UAFB bioprocess // Bioresource Technol. 2007. Vol. 98. P. 3080–3083.

19. Smiti N., Ollivier B., Garcia J.L. Thermophilic degradation of cellulose by a triculture of *Clostridium thermocellum*, *Methanobacterium* sp. and *Methanosarcina* MP // FEMS Microbiol. Lett. 1986. Vol. 35. P. 93–97.

20. Nozhevnikova A.N., Zepp K., Vazquez F., Zehnder A.J.B., Holliger C. Evidence for the existence of psychrophilic methanogenic communities in anoxic sediments of deep lakes // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69. P. 1832–1835.

21. Li T., Mazéas, Sghir A., Leblon G., Bouchez T. Insights into networks of functional microbes catalysing methanization of cellulose under mesophilic conditions // Environ. Microbiol. 2009. Vol. 11. P. 889–904.

22. Заварзин Г.А. Микробное сообщество в прошлом и настоящем // Микробиология. 1989. Т. 51. С. 3–14.

23. Weimer P.J., Zeikus J.G. One carbon metabolism in methanogenic bacteria. Cellular characterization and growth of *Methanosarcina barkeri* // Arch. Microbiol. 1978. Vol. 119. P. 49–57.

24. Звягинцев Д.Г., Асеева И.В., Бабьева И.П., Мурчинк Т.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 303 с.

25. Whitman W.B., Bowen T.L., Boone D.R. The methanogenic bacteria // The Prokaryotes, a handbook of the biology of bacteria / Eds. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer. NY.: Springer Verlag, 1992. P. 719–767.

26. Asakawa S., Akagawa-Matsushita M., Morii H., Koga Y., Hayano K. Characterization of *Methanosarcina mazei* TMA isolated from a paddy field soil // Curr. Microbiol. 1995. Vol. 31. P. 34–38.

27. Speece R. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Nashville: Archae Press, 1996. P. 29–58.

28. Han Y., Dague R. Laboratory studies on temperature-phased anaerobic digestion of domestic primary sludge // Water Environment Research. 1997. Vol. 69. 1139–1143.

29. De León C., Jenkins D. Removal of fecal coliforms by thermophilic anaerobic digestion // Water Science Technology. 2002. Vol. 46. P. 147–152.

30. Sahlström L. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants // Bioresour Technol. 2003. Vol. 87. P. 161–166.

31. Reusser S., Zelinka G. Laboratory-scale comparison of anaerobic-digestion alternatives // Water Environment Research. 2004. Vol. 76. P. 360–380.

32. Nishio N., Nakashimada Y. Recent development of anaerobic digestion processes for energy recovery from wastes // J. of Bioscience and Bioengineering. 2007. Vol. 103. P. 105–112.

33. Pommier S., Mañas L.A., Lefebvre X. Analysis of the outcome of shredding pretreatment on the anaerobic biodegradability of paper and cardboard materials // Bioresource Technology. 2010. Vol. 101. P. 463–468.

34. Заварзин Г.А. Эмиссия метана с территории России // Микробиология. 1997. Т. 66. С. 669–673.

Поступила в редакцию
15.09.10

THERMOPHILIC ANAEROBIC MICROBIAL COMMUNITIES THAT TRANSFORM CELLULOSE INTO METHANE (BIOGAS)

E.A. Tsavkelova, M.A. Egorova, E.V. Petrova, A.I. Netrusov

Several anaerobic microbial communities that produce biogas from cellulose were isolated and examined from 24 different natural and anthropogenic sources. The most active methane producers have been selected under thermophilic conditions (+55°C). In order to optimize the cultivation conditions for better growth and development of both cellulolytics and methanogens, the modified medium has been developed. The most stable microbial consortia maintained their activities in biogas formation for at least 5 passages. The composition of biogas has been studied by using gas chromatography. In average, the percentage of methane in produced biogas reached 60%. Microscopy studies of anaerobic microbial communities revealed the presence of morphologically different cells that varied as community stabilized.

Key words: biogas, methane, cellulose, anaerobic microbial communities, thermophilic conditions.

Сведения об авторах

Цавкелова Елена Аркадьевна — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: tsavkelova@mail.ru

Егорова Мария Анатольевна — канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: egorovamasha@yahoo.com

Петрова Елена Вячеславовна — аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-56; e-mail: esleпова@list.ru

Нетрусов Александр Иванович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: anetrusov@mail.ru