

ВЫДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *THERMOANAEROBACTERIUM* ИЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ МЕТАНОГЕННЫХ СООБЩЕСТВ

© 2021 г. Л. И. Попова^{a, b}, Х. Баль^b, М. А. Егорова^a, М. Р. Леонтьева^a,
А. И. Нетрусов^a, Е. А. Цавкелова^{a, *}

^aКафедра микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^bДепартамент микробиологии математического и естественно-научного
факультета Университета, г. Росток, Германия

*e-mail: tsavkelova@mail.ru

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 22.10.2020 г.

Принята к публикации 26.10.2020 г.

Из двух лабораторных термофильных анаэробных целлюлозолитических метаногенных сообществ, культивируемых на различных типах бумажных субстратов, путем высева на агаризованные среды СМ3 и GS2 при 55°C были получены отдельные колонии, и выделены чистые культуры, принадлежащие к роду *Thermoanaerobacterium*. Для трех изолятов показана их целлюлозолитическая активность при росте на плотных и жидких средах с МКЦ и фильтровальной бумагой в качестве субстратов. При исследовании филогенетического родства этих изолятов с референсными штаммами *T. thermosaccharolyticum* DSM 571, M0795, TG57 два изолята (I2 и I3) кластеризовались с ними, тогда как изолят I1 не попал в достоверно выделенный кластер с представителями этого вида и формировал отдельную ветвь. Отличительной особенностью изолята I2 является образование им нерастворимого желтого аффинного вещества (YAS), характерного для таких анаэробных целлюлозолитиков, как *Clostridium thermocellum*, и служащего связывающим агентом между целлюлазой и субстратом. Результаты, полученные нами, свидетельствуют о том, что целлюлозолитические штаммы рода *Thermoanaerobacterium* входят в доминирующие популяции целлюлозолитиков при биоконверсии бумажных субстратов в биогаз в термофильных условиях. Несмотря на то, что у типового штамма *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 нет целлюлозолитической способности, наши результаты согласуются с недавними данными исследователей о способности ряда штаммов *T. thermosaccharolyticum* к деструкции целлюлозы.

Ключевые слова: анаэробное микробное сообщество, биоразложение целлюлозы, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*

DOI: 10.31857/S0026365621020105

Современная биоэнергетика использует различные типы биотоплива, среди которых наибольшее распространение имеет получение биогаза в результате микробиологической переработки отходов сельского хозяйства и животноводства, а также органических бытовых, муниципальных и промышленных стоков. Особый интерес вызывают целлюлозосодержащие субстраты, представленные биомассой растений (Sun, Cheng, 2002; Цавкелова, Нетрусов, 2012). Отличительной чертой деструкторов целлюлозы является высокая экспрессия ими пула гидролитических ферментов, в которых основную роль играют целлюлазы, осуществляющие гидролиз β-1,4-гликозидных связей в молекулах целлюлозы и относящиеся к семейству гликозилгидролаз (К.Ф. 3.2.1). Среди аэробных бактерий наиболее активными целлюлозолитиками

являются *Cellulomonas* и *Thermobifida* (Lynd et al., 2002). Целлюлазная система аэробных бактерий, в основном, представлена эндоглюканазами и меньшим количеством экзоглюканаз (Рабинович, Мельник, 2000). Факультативные и строгие анаэробные целлюлозолитики обнаружены среди комменсалов травоядных жвачных животных — это *Ruminococcus*, *Fibrobacter* и *Butyrivibrio*, группы экстремофилов — *Caldicellulosiruptor*, *Thermotoga*, *Anaerocellum* и *Halocella* (Koeck et al., 2014), а также выделенных из различных микробных консорциумов представителей родов *Acetivibrio*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus* и *Herbinex* (Lynd et al., 2002). В отличие от аэробных бактерий, которые синтезируют и выделяют наружу целлюлазы в достаточной высокой концентрации, строгие анаэробы предпочитают другую стратегию, выражающуюся

шуются в наличии на их клеточной поверхности мультиферментного комплекса – целлюлосомы, позволяющей обеспечивать высокую эффективность разложения целлюлозы даже при низких концентрациях ферментов (Рабинович, Мельник, 2000; Цавкелова, Нетрусов, 2012). На примере целлюлозоразлагающих клостридий *C. thermocellum* показано, что структурная организация целлюлосом, объединяющих 15–25 различных ферментов с целлюлазной и другими гидролитическими активностями, а также интегрирующие их структурные белки скаффолдины, позволяют достигнуть синергизма в активности ферментов за счет оптимизации одновременного их воздействия на субстрат, а также отсутствия конкуренции за ограниченное количество сайтов связывания с субстратом (Lynd et al., 2002). Эффективность биоразложения целлюлозы определяется адгезией анаэробных микроорганизмов на субстрате.

Среди представителей порядка *Clostridiales* наиболее характерными деструкторами целлюлозы являются виды родов *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, а также *Thermoanaerobacter*, *Caloramator* и *Caldicellulosiruptor* (Vishnivetskaya et al., 2015), а *Thermotoga* являются экстремофилами с оптимумом роста выше 70°C и, в отличие от других анаэробов, не содержат целлюлосом и синтезируют несвязанные с клетками целлюлазы (VanFossen et al., 2008). В последнее время все больше внимания уделяют поиску новых продуцентов термостабильных целлюлаз (Великодворская и соавт., 2013; Коек et al., 2014). Так, у термофильной целлюлозолитической бактерии *Herbinix hemicellulosilytica* температурный оптимум роста составляет 55°C (Коек et al., 2015), а *Fervidobacterium riparium*, являющийся анаэробным грамотрицательным термофилом, способен расти на целлюлозе, ксилане и целлобиозе при 65°C (Podosokorskaya et al., 2011).

Ранее нами были выделены целлюлозолитические термофильные микробные сообщества (МС), осуществляющие биоконверсию в биогаз ряда целлюлозосодержащих субстратов при 55°C (Цавкелова и соавт., 2012; Tsavkelova et al., 2018). Состав бактерий и архей наиболее активных консорциумов был изучен с помощью молекулярно-биологических методов: ДГГЭ (денатурирующего градиентного гель-электрофореза) и высокопроизводительного секвенирования (ВПС) на базе платформы MiSeq-Illumina. Результаты этих исследований показали значительное различие в составе микробных сообществ при их культивировании на некоторых типах бумаг. Наиболее разнообразными по составу были те сообщества, которые культивировали на офисной бумаге, картоне, а также на смеси легкоразлагаемых и трудноразлагаемых типов бумаг, тогда как отдельно на газетной и журнальной бумагах состав сообщества резко сокращался, в основном за счет синтрофной группы микроорга-

низмов, что также отрицательно влияло на эффективность биоконверсии субстрата в биогаз (Tsavkelova et al., 2018). Среди бактерий, входящих в состав наиболее эффективных целлюлозоразлагающих консорциумов, доминирующим филумом были *Firmicutes* (*Acetivibrio*, *Herbinix*, *Thermoanaerobacterium*, *Tepidanaerobacter*), а среди метаногенных архей – *Methanothermobacter* и *Methanosarcina* (Tsavkelova et al., 2018). Подавляющее большинство целлюлозолитических бактерий принадлежало к классу *Clostridia* и двум порядкам: *Clostridiales* и *Thermoanaerobacteriales*.

Целью настоящей работы было выделение в чистую культуру, идентификация и изучение целлюлозолитических свойств представителей порядка *Thermoanaerobacteriales*, составляющих доминирующие популяции в термофильном метаногенном сообществе, как малоизученных в этом отношении микроорганизмов, большинство из которых до недавнего времени считались неспособными к биодegradации целлюлозы (Lynd et al., 2002; Pei et al., 2012).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования стали анаэробные целлюлозолитические термоанаэробактерии, выделенные из метаногенных термофильных сообществ $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ (Tsavkelova et al., 2018), которые культивировали на среде следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 1.0; KH_2PO_4 – 1.0; NH_4Cl – 2.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.1; $NaCl$ – 0.1; $CaCO_3$ – 1.0; $NaHCO_3$ – 5.0; дрожжевой экстракт – 2.0; пептон – 1.0; раствор микроэлементов – 1 мл; резаурин – 0.5 мг/л; вода дистиллированная – 1000 мл; pH 7.0–7.5. Раствор микроэлементов содержал (мг/л): $ZnCl_2$ – 70.0; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 100.0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 190.0; H_3BO_3 – 6.0; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 36.0; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2.0; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ – 24.0; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ – 15.0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.0 г/л. Сульфат железа предварительно растворяли в 10 мл 25% HCl; вода дистиллированная – 990 мл, pH среды 7.0. Условия культивирования микроорганизмов при 55°C описаны подробно ранее (Цавкелова и соавт., 2012). В качестве субстрата использовали фильтровальную бумагу Whatman® № 1 в количестве 15 г/л, предварительно разрезанную на фрагменты 0.5 см².

Выделение чистой культуры целлюлозолитических бактерий проводили высевом на плотные питательные среды с целью получения отдельных колоний. Для этого отбирали аликвоту (100 мкл) из исходных целлюлозолитических микробных анаэробных сообществ (ЦМАС) $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$, а также из последовательных их десятикратных разведений (до 10^{-10}), засеивали в толщу агаризованных сред CM3 (Atlas, 1946; среда № 520 из коллекции DSMZ) и GS2 (Johnson et al., 1981), содержащих в

качестве источника углерода 5 г/л микрокристаллической целлюлозы (МКЦ, “Macherey-Nagel”, Германия) или целлобиозу в концентрации 10 г/л. Посевной материал вносили в расплавленную агаризованную среду, охлажденную до температуры ниже 50°C, перемешивали и разливали в чашки Петри. Для получения отдельных колоний также использовали способ высева на двухслойные агаризованные среды в соответствии с ранее описанной методикой (Lv, Yu, 2012), где в качестве нижнего слоя использовали минеральную среду с 2%-ым “голодным агаром” без источника углерода, а верхний слой содержал 0.8% СМЗ-агара с МКЦ или целлюлозой, гидролизованной с помощью фосфорной кислоты для получения аморфной целлюлозы (Zhang et al., 2006). Аликвоту посевного материала (100 мкл) вносили в расплавленный и охлажденный верхний слой, перемешивали и заливали в чашки Петри с уже застывшим нижним слоем.

Культивирование засеянных чашек Петри проводили в анаэробном боксе в течение 2–3 сут при 55°C. После появления единичных колоний их пересевали в жидкие среды (СМЗ и GS2) с фильтровальной бумагой в качестве субстрата. Из пробирок, в которых наблюдали деградацию субстрата, проводили дополнительные рассевы на плотные среды, а полученные колонии культивировали в жидкой среде в течение не менее трех пассажей для того, чтобы убедиться, что культуры не теряют способность к разложению целлюлозы (Koesck et al., 2015). Целлюлазную активность оценивали визуально по полной деструкции субстрата (фильтровальная бумага), а также по содержанию редуцирующих сахаров в культуральной жидкости после разложения фильтровальной бумаги с помощью ДНСК (3,5-динитросалициловая кислота), в соответствии с методикой, описанной ранее (Прокудина и соавт., 2016). Результаты реакции оценивали колориметрически при 540 нм на спектрофотометре (Hitachi 200-20, Япония) качественно: “–” – отсутствие окрашивания, “±” – слабое окрашивание, “+” – интенсивное окрашивание.

Филогенетический анализ микроорганизмов.

Выделение ДНК проводили с использованием фенол-хлороформного метода или с использованием набора Blood/Genomic DNA Purification Mini Spin Column Kit (“Genaxxon”, ФРГ). Для амплификации участка гена 16S рРНК использовали систему универсальных праймеров EUB1 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и EUB2 (5'-AGAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), занимающих, соответственно, позиции 27–45 и 1542–1561 в геноме *E. coli* с помощью набора реактивов DreamTaq Green PCR Master Mix (“Thermo Scientific”, ФРГ). Рабочая смесь (60 мкМ) для ПЦР составляла 25 мкл DreamTaq Green PCR Master Mix, с содержащимися в буферном растворе смесью

нуклеотидов, MgCl₂ и полимеразой DreamTaq DNA Polymerase, а также 50 мкл (10 мкМ) каждого праймера и 1 мкл ДНК (100 нг); до требуемого объема доводили стерильной деионизированной Milli-Q водой. Использовали следующую последовательность циклов нагревания–охлаждения: денатурирующую стадию проводили при 94°C 5 мин, далее в каждом цикле денатурацию проводили при 94°C 20 с, отжиг – при 48°C в течение 30 с и элонгацию – при 72°C в течение 2 мин. В последующих циклах денатурацию проводили при 94°C 20 с, отжиг – при 45°C в течение 30 с и элонгацию – при 72°C в течение 1 мин. ПЦР-продукты амплификации (1 мкл) просматривали на агарозном 0.8% геле, в качестве маркера использовали DNA-Marker 1 kb (MassRuler “Thermo Fisher”, ФРГ).

Полученные продукты амплификации (1500 п.н.) очищали согласно протоколу с помощью набора NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (“Macherey-Nagel”, ФРГ) и секвенировали в компании “LGC Genomics GmbH” (ФРГ). Полученные последовательности генов 16S рРНК обрабатывали в программе UGENE. Анализ и сравнение данных проводили с последовательностями, имеющимися в базе данных BLAST [NCBI (Национальный центр биотехнологии, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)]. Сравнение контигов и гомологичных участков последовательностей полных геномов проводили в программе UGENE с помощью метода выравнивая по алгоритму Muscle. Для построения филогенетического дерева использовали программу MegaX и алгоритм Neighbour-Joining. Оценку достоверности топологии дендрограммы осуществляли с помощью “bootstrap” анализа 1000 альтернативных деревьев в той же программе. Множественное выравнивание частичных последовательностей нуклеотидов по 16S rRNA, построенное с помощью программы UGENE, проводили на основании трех биологических повторностей (выделение ДНК проводили каждый раз из заново полученной биомассы) для каждого изолята.

Микроскопия. Изучение морфологии клеток выделенных культур проводили на фиксированных окрашенных основным фуксином препаратах с использованием светового микроскопа Olympus BX41TF (ФРГ). Для сканирующей электронной микроскопии образцы ЦМАС, из которых проводили выделение чистых культур, были подготовлены, зафиксированы и напылены согласно описанной ранее методике (Tsavkelova et al., 2018). Микроскопирование проводили с помощью сканирующего аналитического электронного микроскопа JSM-6380LA (“Jeol”, Япония) на базе межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

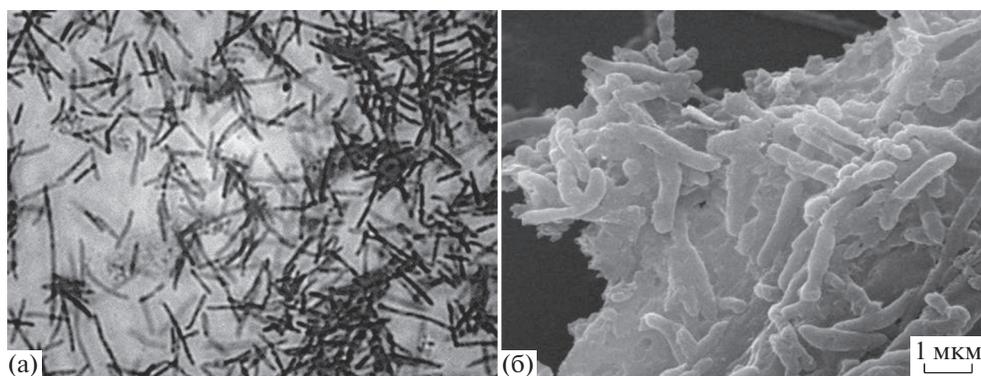


Рис. 1. Морфология клеток анаэробных целлюлозолитических бактерий. Слева (а) культура *Thermoanaerobacterium* sp. (изолят I2) при выращивании на жидкой среде GS2 (световая микроскопия; $\times 2000$; Olympus BX41TF). Справа (б) – адгезия целлюлозолитиков на фильтровальной бумаге (СЭМ; JSM-6380LA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение чистых культур. При выделении на агаризованных средах (СМЗ и GS2) чистых культур целлюлозолитических бактерий, которые потенциально могли оказаться принадлежащими к роду *Thermoanaerobacterium*, из ЦМАС $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ (Tsavkelova et al., 2018) было получено 150 отдельных колоний, которые были затем вновь пересеяны на те же среды, содержащие МКЦ. Большинство из них, однако, при дальнейших пересевах прекращали свой рост на целлюлозе в качестве единственного источника углерода. В результате нами были отобраны три изолята, которые после пересевов в течение не менее трех пассажей и микроскопирования оставались однородными и активными в отношении деградации целлюлозы. Им были присвоены условные номера: изолят 1 (I1), изолят 2 (I2) и изолят 3 (I3). Изолят I1 был выделен из микробного термофильного сообщества $\Sigma 4$, а два других изолята – из сообщества $\Sigma 7$. Эти два сообщества исходно отличались тем, что $\Sigma 4$ сообщество объединяло четыре наиболее активных метаногенных консорциума, выделенных ранее (Цавкелова и соавт., 2012; Tsavkelova et al., 2018) из навоза крупного рогатого скота, донных осадков и помета копытных животных, а сообщество $\Sigma 7$ дополнительно содержало инокулят, полученный из навоза пони и черной антилопы, а также жома красного винограда.

Морфология клеток и разложение целлюлозы. Выделенные культуры представляют собой палочки с округлыми концами, длиной около 2.0–10.0 мкм, расположенные одиночно и парами, реже в цепочках. У всех изолятов было отмечено спорообразование при выращивании в жидкой среде GS2. Колонии, которые образовывали культуры на среде СМЗ, были небольшими (2–3 мм в диаметре), плоскими и округлыми, имели сероватый оттенок. На рис. 1 представлены микрофотографии изолята I2, выращенного на жидкой среде GS2

(оптическая микроскопия) и при культивировании на фильтровальной бумаге (СЭМ), где можно видеть адгезию клеток на субстрате с формированием агрегатов и микроколоний.

При дальнейшем пассировании в жидкой среде GS2 с фильтровальной бумагой в качестве единственного субстрата в течение 5 пассажей, изоляты сохранили способность к деструкции целлюлозы, однако их активность различалась. У всех трех изолятов было отмечено разложение фильтровальной бумаги с образованием сахаров в среде (по реакции с ДНСК), но наиболее быстрое использование (в течение 4 сут) фильтровальной бумаги наблюдали для изолята I1, тогда как изоляты I2 и I3 разлагали субстрат за 7 и 10 сут соответственно. Характерным признаком при росте изолята I2 на жидкой среде стало то, что по мере использования фильтровальной бумаги, он активно образовывал желтый пигмент, типичный для некоторых анаэробных целлюлозолитиков, что также косвенно свидетельствует об использовании им целлюлозы в анаэробных условиях.

Филогенетическое положение. На следующем этапе работы было проведено секвенирование участка гена 16S рРНК для каждого из изолятов с использованием пары универсальных праймеров EUB1 и EUB2. Для I1, I2 и I3 полученные последовательности были депонированы в генбанке (NCBI) с идентичностью 97.34, 99.39 и 100% с *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571; 97.34, 99.39 и 100% с *T. thermosaccharolyticum* M0795; 97.23, 99.30 и 99.84% с *T. thermosaccharolyticum* TG57 под номерами MT859098, MT887224 и MT887225 соответственно. При объединении последовательностей в контиги длиной 1300–1400 п.о. были получены данные, представленные в табл. 1. При сопоставлении референсных геномов с исследуемыми последовательностями 16S rRNA среди гомологичных участков доля совпадающих нуклеотидов была выше 97% (“Identity”), а значе-

Таблица 1. Филогенетическое родство анаэробных целлюлозолитиков, принадлежащих к роду *Thermoanaerobacterium*, по результатам сиквенса участка гена 16S рПНК

Изоляты	Исходное микробное сообщество	Максимальная гомология по данным базы NCBI	Гомология, %
Изолят И1	Σ4	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP002171.1)	97.63
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	97.63
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	97.55
Изолят И2	Σ7	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	99.48
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP002171.1)	99.48
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	99.41
Изолят И3	Σ7	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	100
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP002171.1)	100
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	99.84

Примечание. Полногеномные последовательности для трех штаммов *T. thermosaccharolyticum* M0795, DSM 571 и TG57 получены из базы данных NCBI. Результаты сиквенса участка гена 16S рПНК для изолятов получены с использованием универсальных праймеров EUB1 и EUB2.

ния E-value ниже 0.01 (BLAST). Согласно полученным результатам, изоляты И2 и И3 имеют более 99% сходства именно со штаммами *T. thermosaccharolyticum* TG57 и *T. thermosaccharolyticum* M0795. Штамм TG57 имеет сходство 99% с типовым штаммом *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 (Li et al., 2018).

Наиболее отличающуюся от описанных ранее штаммов последовательность имел изолят И1: его идентичность со штаммами *T. thermosaccharolyticum* составила 97.63% для M0795 и DSM 571 и 97.55% для TG57 (табл. 1), что является недостаточным основанием для видового соответствия и идентификации. Наиболее вариабельные участки находятся в координатах выравнивания 4–54, 793–840 и 858–1036, среди которых встречались инсерции (1–2 нуклеотида), делеции (5 нуклеотидов), трансверсии и транзиции (данные не представлены).

Для анализа структурного и эволюционного филогенетического родства выделенных изолятов с уже известными штаммами было выполнено множество локальное выравнивание с помощью программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) и UGENE (“Унипро”, Россия). В качестве референсных штаммов были выбраны последовательности гена 16S рПНК, извлеченные из

полных геномов *T. thermosaccharolyticum* штаммов DSM 571, TG57 и M0795, а также ряда других видов одноименного рода: *T. xylanolyticum*, *T. saccharolyticum*, *T. calidifontis*, *T. islandicum*, *T. aciditolerans*, *T. themosulfurigenes*, *T. aotearoense*, *T. butyriciformans*, *T. themostercoris*, *T. bryantii*. В результате проведенного анализа были построены три филогенетических дерева с использованием методов максимального правдоподобия (Maximum-likelihood), ближайшего соседа (Neighbor-Joining) и максимальной экономии (Parsimony).

Все три филограммы имеют сходную базовую топологию, однако различаются по величинам достоверности ветвления кластеров. Так, на дереве, построенном по алгоритму максимального правдоподобия (Maximum-likelihood, рис. 2а), все три изолята отвечают в группу с узлом ветвления 81% вместе с представителями вида *T. thermosaccharolyticum*, при этом внутри кластера достоверность узлов ветвления составляет 45–59%. В то же время при использовании алгоритма Neighbor-Joining (рис. 2б) изоляты И2 и И3 кластеризуются со штаммами *T. thermosaccharolyticum* M0795, DSM 571 и TG57 с величиной достоверности 88%, тогда как изолят И1 формирует отдельную ветвь на уровне умеренной поддержки ветвления

66%. Аналогичная топология ветвления наблюдается и для дендрограммы, построенной с помощью Parsimony анализа (рис. 2в), где изолят П1 не формирует достоверно определяемый кластер (ближайший, как и в случае филлограммы 2б, к *T. bryantii*), что с большей вероятностью свидетельствует о том, что этот изолят принадлежит к другому виду из рода *Thermoanaerobacterium*. Однако для проверки этой гипотезы необходим дальнейший анализ, в том числе по функциональным генам, участвующим в разложении целлюлозы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные нами в этой работе, о способности представителей *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* к биоразложению целлюлозы и выделение чистых культур подтверждают наши предыдущие данные по ДГГЭ анализу состава термофильных анаэробных сообществ (Tsavkelova et al., 2018), где бактериальные популяции этого вида занимали доминирующее положение. При этом они встречались не только в составе консорциумов, культивируемых на легкоразлагаемых субстратах: офисной бумаге и гофрированном картоне, но и на трудноразлагаемых журнальной и газетной бумагах, а также на смеси этих субстратов. Таким образом, микроорганизмы, принадлежащие к роду *Thermoanaerobacterium*, способные к разложению целлюлозосодержащих субстратов с низким содержанием лигнина (на примере бумажной продукции), являются активными анаэробными гидролитиками в термофильных метаногенных сообществах, культивируемых при 55°C.

Термофильные изоляты из рода *Thermoanaerobacterium* могут представлять интерес как источник целлюлаз, активных при высоких температурах. Так, новая термо- и галотолерантная целлюлаза была выделена из *Thermoanaerobacterium* sp., изолированного из горячего источника в Исландии (Zarafeta et al., 2016). Этот фермент (CelDZ1) оказался активным при pH 5.0 в широком диапазоне температур с оптимумом при 70°C в отношении растворимых полимерных субстратов, содержащих β -1,4 гликозидные связи, например, КМЦ и β -D-глюкана, однако неактивен по отношению к фильтровальной бумаге и Avicel. В нашем исследовании мы также использовали в качестве одного из субстратов целлюлозу (МКЦ) с аморфными участками после обработки фосфорной кислотой (PASC – phosphoric acid swollen cellulose; Zhang et al., 2006), что увеличивает возможность ее использования целлюлозолитиками.

При выделении чистых культур изолятов мы использовали метод получения отдельных колоний микроорганизмов. При этом известно, что даже визуально различимые единичные колонии

анаэробных целлюлозолитиков, что было показано на примере *Clostridium thermocellum* СТ1 и СТ2, могут представлять собой не единственную культуру, а соседствовать с нецеллюлозолитическими колониями-спутниками (Sizova et al., 2011). Полученные изоляты подтвердили свою целлюлозолитическую активность в течение нескольких пересевов на жидкой среде с фильтровальной бумагой в качестве субстрата. Образующийся изолятом I2 желтый пигмент, согласно литературным данным, является водонерастворимым соединением, названным “желтым афинным веществом” (от англ. yellow affinity substance, YAS), которое при росте на целлюлозосодержащих субстратах синтезирует *Clostridium thermocellum* (Ljungdahl et al., 1983; Kannuchamy et al., 2016), а также некоторые другие анаэробные целлюлозолитики, например, *Ruminococcus flavefaciens* (Кореспу, Hodrova, 1997). Считается, что это каротиноидоподобное соединение, которое легко обесцвечивается при контакте с кислородом, а его роль заключается в адгезии целлюлосомы к целлюлозе, что повышает ее аффинность к субстрату (Ljungdahl et al., 1983; Кореспу, Hodrova, 1997).

Все выделенные нами изоляты показывали наибольшее сходство с представителями рода *Thermoanaerobacterium*, преимущественно с видом *T. thermosaccharolyticum* (ранее *Clostridium thermosaccharolyticum*). Типовым штаммом этого вида является *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 (De Vos et al., 2009). Согласно базе данных GenBank (NCBI CP003066.1), у данного штамма не обнаружено функционального гена β -глюкозидазы, необходимого для расщепления целлюлозы. Соответственно, рост штамма *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 на целлюлозе в качестве единственного субстрата невозможен из-за отсутствия основного фермента, разлагающего целлюлозу (Pei et al., 2012). В литературе упоминается о неспособности представителей *T. thermosaccharolyticum* к использованию целлюлозы (Lynd et al., 2002; Pei et al., 2012). При этом нецеллюлозолитические представители *Thermoanaerobacterium* могут быть спутниками для целлюлозолитиков, например, *Clostridium thermocellum*, которая адгезируется на волокнах целлюлозы, а *T. thermosaccharolyticum* находится в виде планктонной культуры, метаболизируя гексозы, образуемые *C. thermocellum* в процессе гидролиза целлюлозы (He et al., 2011). В то же время у штамма *T. thermosaccharolyticum* M0795 (CP003066.1) геном полностью секвенирован, и в нем подтверждено наличие гена β -глюкозидазы (Shaw et al., 2010).

К настоящему времени уже описано несколько штаммов, принадлежащих к виду *T. thermosaccharolyticum*, способных к деструкции целлюлозы, — это *T. thermosaccharolyticum* M5 (Jiang et al., 2015), *T. thermosaccharolyticum* M0795 (Shaw et al., 2010), *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (O-Thong et al.,

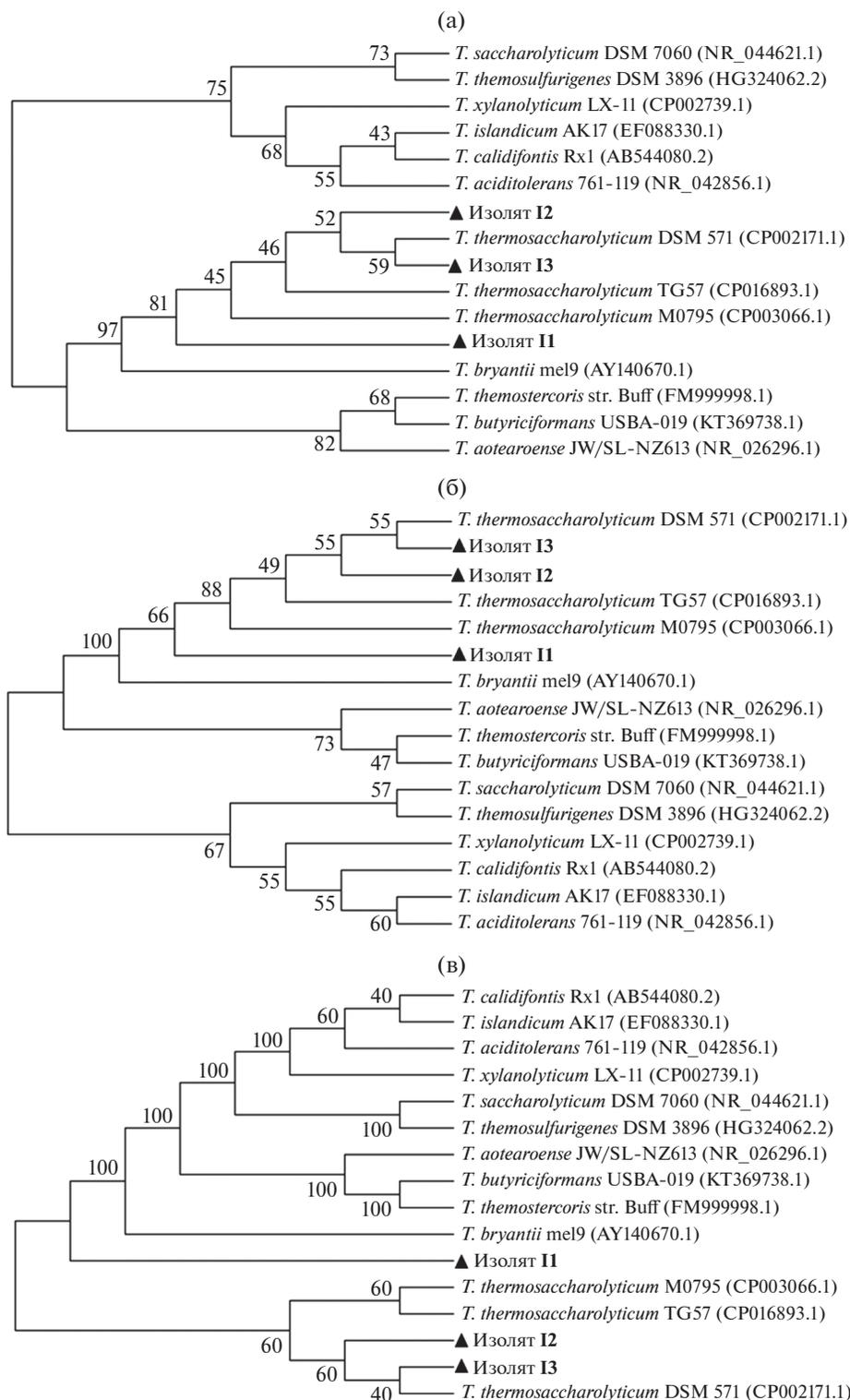


Рис. 2. Филогенетическое древо последовательностей 16S рРНК изолятов, принадлежащих *Thermoanaerobacterium* (1214 п.н.), выделенных из термофильных метаногенных сообществ. Дендрограммы построены на основании анализа множественного выравнивания исследуемых контигов и референсных последовательностей в программе MEGA X[®] с помощью методов Maximum Likelihood (а), Neighbor-Joining (б), Maximum Parsimony (в). В качестве реперных образцов использованы последовательности 16S rRNA (номера указаны согласно базе данных NCBI) нескольких штаммов *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *T. xylanolyticum*, *T. saccharolyticum*, *T. calidifontis*, *T. islandicum*, *T. aciditolerans*, *T. thomosulfurigenes*, *T. aotearoense*, *T. butyriciformans*, *T. thomostercoris*, *T. bryantii*. Значимость разбиения на кластеры указана в цифрах, обозначающих достоверность ветвления согласно бутстреп (bootstrap) анализу (% от 1000 реплик).

2008), а также *T. thermosaccharolyticum* TG57 (Li et al., 2018). Среди них особый практический интерес представляет *T. thermosaccharolyticum* TG57, обладающий высокой активностью бутанодегидрогеназы и эндоцеллюлазы, который при культивировании на среде с 3%-ой МКЦ образует 1.9 г/л бутанола (Li et al., 2018).

В соответствии с литературными данными, таким образом, внутри вида *T. thermosaccharolyticum* имеются штаммы, обладающие функциональным ферментом β-глюкозидазой (*T. thermosaccharolyticum* TG57) и штаммы, у которых этот фермент неактивен (*T. thermosaccharolyticum* DSM 571), что определяет их неспособность к разложению целлюлозы. Результаты нашего исследования показали, что выделенные целлюлозолитики относятся к роду *Thermoanaerobacterium*, при этом нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК изолятов I2 и I3 более чем на 99% соответствовали последовательностям *T. thermosaccharolyticum* TG57, DSM 571 и M0795 (по базе данных NCBI). Согласно филогенетическому анализу, изоляты I2 и I3 формируют единый кластер с *T. thermosaccharolyticum*. Однако изолят II не попал в один достоверно выделенный кластер с другими изолятами и имеет менее 98% гомологии со штаммами *T. thermosaccharolyticum*, что является недостаточным условием для идентификации на уровне вида. На филограммах, построенных с помощью трех разных алгоритмов, изолят II формирует отдельную ветвь, но с достоверностью объединения организмов в единый кластер лишь 81% (Maximum-likelihood) между представителями *T. thermosaccharolyticum* и *T. bryantii*, на основании чего можно полагать, что изолят II принадлежит к новому виду *Thermoanaerobacterium*.

Наши результаты позволили выявить целлюлозолитические свойства представителей рода *Thermoanaerobacterium* и их роль в составе метаногенных термофильных микробных консорциумов, культивируемых на различного типа бумагах, однако в дальнейшем необходим более детальный анализ генома этих микроорганизмов для определения функциональных генов и кодируемых ими ферментов для изучения их филогенетического положения, а также потенциального использования в биотехнологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Л.И. Попова выражает благодарность Германской службе академических обменов (DAAD) и Федерации Европейских микробиологических сообществ (FEMS) за финансовую поддержку стажировки в департаменте микробиологии Университета г. Росток (Германия).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Великодворская Г.А., Чекановская Л.А., Лунина Н.А., Сергиенко О.В., Лунин В.Г., Дворцов И.А., Зверлов В.В. Углевод-связывающий модуль 28 семейства термостабильной эндо-глюканазы CelD из анаэробного микроорганизма *Caldicellulosiruptor bescii* необходим для максимальной активности фермента и необратимо связывается с аморфной целлюлозой // Мол. биол. 2013. Т. 47. С. 667–667.
- Velikodvorskaya G.A., Chekanovskaya L.A., Lunina N.A., Dvortsov I.A., Zverlov V.V., Sergienko O.V., Lunin V.G. Family 28 carbohydrate-binding module of the thermostable endo-1,4-β-glucanase CelD from *Caldicellulosiruptor bescii* maximizes enzyme activity and irreversibly binds to amorphous cellulose // Mol. Biol. 2013. V. 47. С. 581–586.
- Рабинович М.Л., Мельник М.С. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биodeградации высокоупорядоченных форм целлюлозы // Успехи биол. хим. 2000. Т. 40. С. 205–266.
- Прокудина Л.И., Осмоловский А.А., Егорова М.А., Малахова Д.В., Нетрусов А.И., Цавкелова Е.А. Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов микромицетами с последующей биоconversion в биогаз // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. 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. 2016. V. 52. P. 190–198.
- 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. 2012. Т. 48. 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. 2012. V. 48. P. 377–384.
- Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И. Получение биогаза из целлюлозосодержащих субстратов (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. 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.
- Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media. N.Y., USA: CRC Press, 2004. 411 p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes / Eds. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. Athens, USA: Springer Science & Business Media, 2009. V. 3. 1422 p.

- He Q., Hemme C.L., Jiang H., He Z., Zhou J. Mechanisms of enhanced cellulose bioethanol fermentation by co-cultivation of *Clostridium* and *Thermoanaerobacter* spp. // *Bioresour. Technol.* 2011. V. 102. P. 9586–9592.
- Jiang H., Gadow S.I., Tanaka Y., Cheng J., Yu-You L. Improved cellulose conversion to bio-hydrogen with thermophilic bacteria and characterization of microbial community in continuous bioreactor // *Biomass Bioenergy.* 2015. V. 75. P. 57–64.
- Johnson E.A., Madia A., Demain A.L. Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1981. V. 41. P. 1060.
- Koeck D.E., Maus I., Wibberg D., Winkler A., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W.H., Schlüter A. Draft genome sequence of *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55T, a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor // *J. Biotechnol.* 2015. V. 214. P. 59–60.
- Koeck D.E., Pechtl A., Zverlov V.V., Schwarz W.H. Genomics of cellulolytic bacteria // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. V. 29. P. 171–183.
- Kopečný J., Hodrova B. The effect of yellow affinity substance on cellulases of *Ruminococcus flavefaciens* // *Lett. Appl. Microbiol.* 1997. V. 25. P. 191–196.
- Li T., Zhang C., Yang K.L., He J. Unique genetic cassettes in a *Thermoanaerobacterium* contribute to simultaneous conversion of cellulose and monosugars into butanol // *Sci. Adv.* 2018. V. 4. e1701475.
- Ljungdahl L.G., Pettersson B., Eriksson K.E., Wiegel J. A yellow affinity substance involved in the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum*. // *Curr. Microbiol.* 1983. V. 9. P. 195–199.
- Lv W., Yu Z. Isolation and characterization of two thermophilic cellulolytic strains of *Clostridium thermocellum* from a compost sample // *J. Appl. Microbiol.* 2013. V. 114. P. 1001–1007.
- Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // *Microbiol. Mol. Biol. R.* 2002. V. 66. P. 506–577.
- O-Thong S., Prasertsan P., Karakashev D., Angelidaki I. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. P. 1204–1214.
- Pei J., Pang Q., Zhao L., Fan S., Shi H. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose // *Biotechnol. Biofuels.* 2012. V. 5. P. 31.
- Podosokorskaya O.A., Merkel A.Y., Kolganova T.V., Chernyh N.A., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Fervidobacterium riparium* sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic bacterium isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 2697–2701.
- Shaw A.J., Hogsett D.A., Lynd L.R. Natural competence in *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium* species // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 4713–4719.
- Sizova M.V., Izquierdo J.A., Panikov N.S., Lynd L.R. Cellulose- and xylan-degrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 2282–2291.
- Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review // *Bioresour. Technol.* 2002. V. 83. P. 1–11.
- 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 Biochem.* 2018. V. 66. P. 183–196.
- Van Fossen A.L., Lewis D.L., Nichols J.D., Kelly R.M. Polysaccharide degradation and synthesis by extremely thermophilic anaerobes // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1125. P. 322–337.
- Vishnivetskaya T.A., Hamilton-Brehm S.D., Podar M., Mosher J.J., Palumbo A.V., Phelps T.J., Keller M., Elkins J.G. Community analysis of plant biomass-degrading microorganisms from Obsidian Pool, Yellowstone National Park // *Microb. Ecol.* 2015. V. 69. P. 333–345.
- Zarafeta D., Kissas D., Sayer C., Gudbergdottir S.R., Ladoukakis E., Isupov M.N., Chatziioannou A., Peng X., Littlechild J.A., Skretas G., Kolisis F.N. Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an Icelandic hot spring isolate // *PLoS One.* 2016. V. 11. e0146454.

Isolation of Cellulose-Degrading *Thermoanaerobacterium* Strains from Thermophilic Methanogenic Microbial Communities

L. I. Popova^{1,2}, H. Bahl², M. A. Egorova¹, M. R. Leont'eva¹, A. I. Netrusov¹, and E. A. Tsavkelova^{1,*}

¹Department of Microbiology, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

²Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Rostock, 18051 Germany

*e-mail: tsavkelova@mail.ru

Received September 2, 2020; revised October 22, 2020; accepted October 26, 2020

Abstract—The cultures assigned to the genus *Thermoanaerobacterium* according to the partial sequencing of the 16S rRNA gene were isolated on CM3 and GS2 media at 55°C from two laboratory methanogenic thermophilic cellulolytic microbial communities producing biogas from various paper substrates. Cellulolytic activity was shown for three isolates grown on solid and in liquid media with microcrystalline cellulose and filter paper as the only substrates. In order to compare the phylogenetic relations between these isolates and the reference strains of *T. thermosaccharolyticum* (DSM 571, M0795, and TG57), it was shown that the isolates I2 and I3 belonged to one cluster, whereas the I1 isolate formed a separate branch on the phylogenetic tree.

A unique feature of isolate I2 is the formation of an insoluble yellow affinity substance (YAS), which is usually produced by certain anaerobic cellulolytic bacteria, such as *Clostridium thermocellum*; it is considered a binding component between the cellulase enzyme and its substrate, cellulose. Our results confirmed that cellulolytic *T. thermosaccharolyticum* strains predominated among cellulose-degrading bacteria within the thermophilic microbial communities converting the paper substrates into biogas. Although the type strain *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 lacks cellulolytic capacity, our results are consistent with the recent data on the ability of several *T. thermosaccharolyticum* strains to degrade cellulose.

Keywords: anaerobic microbial community, cellulose biodegradation, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*