

И.Р. Притула, А.Б. Таширев

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д 13680, Украина*

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ВОДОРОДОБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *CLOSTRIDIUM*

Усовершенствован метод выделения и количественного учета чистых культур облигатно-анаэробных водородобразующих клостридий. Из ассоциации спорообразующих бактерий выделен штамм водородобразующих бактерий *Clostridium* sp. ВУ-11. При росте штамма на жидкой среде определены количественные показатели синтеза водорода и сбраживания крахмала. Концентрация H_2 в газовой фазе – 49 %, из 1 кг крахмала микроорганизмы синтезировали 128 л H_2 за 6 суток масса крахмала уменьшалась в 7 раз. Указанные показатели синтеза водорода и сбраживания крахмала, а также в дальнейшем других модельных органических субстратов являются основой для создания промышленной биотехнологии получения энергоносителя – водорода при обезвреживании экологически опасных твердых пищевых отходов.

Ключевые слова: биотехнологии синтеза энергоносителей, водородобразующая ассоциация, *Clostridium* sp., техника анаэробноза.

Клостридии и другие анаэробные водородобразующие бактерии используются в биотехнологиях синтеза молекулярного водорода при сбраживании органических субстратов (dark fermentation) [5]. Такое брожение может быть проведено как с помощью чистых культур водородобразующих бактерий, так и ассоциаций. В состав ассоциаций также могут входить не образующие водород бактерии. Использование ассоциаций технологически более оправдано, так как несколько видов могут одновременно сбраживать широкий спектр субстратов, что уменьшает стоимость и повышает эффективность процесса синтеза H_2 . Кроме того, ассоциации являются более стабильными в промышленных условиях, чем чистые культуры микроорганизмов. Тем не менее, для промышленного синтеза H_2 чаще всего используют чистые культуры. Основными аргументами в их пользу являются: избирательность субстратов, легко достигаемая регуляция метаболизма, высокий суммарный синтез H_2 вследствие уменьшения выхода нежелательных продуктов метаболизма. Кроме того, считается, что синтез H_2 на основе чистых культур является легко воспроизводимым. Однако использование чистых культур для синтеза H_2 значительно повышает его себестоимость вследствие дороговизны стерильных условий культивирования [6].

В последние годы наибольшее количество среди работ по получению H_2 хемоорганотрофными бактериями посвящено использованию чистых культур клостридий и ассоциаций [7]. Ранее нами из пастеризованной почвы получена ассоциация *Bacillus* и *Clostridium*, которая быстро сбраживает картофель и крахмал и в больших количествах синтезирует H_2 [2]. Для направленной регуляции синтеза H_2 с помощью ассоциаций или чистых культур бактерий необходимым является выделение и изучение типовых (репрезентативных) штаммов. Важными задачами для получения изолированных колоний является оптимизация условий культивирования на жидких и твердых питательных средах, выбор метода культивирования, подбор источника питания и восстановителя, определение необходимых для микроорганизмов факторов роста.

Среди методов выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов надежными и удобными являются метод покровных стеклянных или полимерных пластинок (метод Штурм в модификации Дуды) [1], культивирование в анаэробных камерах типа анаэроостатов и перчаточных боксах, метод Хангейта и его модификации [4]. Анаэробные условия достигаются применением физических, химических и биологических методов или их комбинированием [1, 3].

В технике культивирования облигатно-анаэробных микроорганизмов наиболее часто используются сульфид (S^{2-})-содержащие восстановители, такие как H_2S , Na_2S , аморфный FeS , цистеин, цистеин-сульфид и др. [1, 4]. Однако большинство из них ингибирующее действуют на клостридии. Поэтому для оптимизации метода культивирования H_2 -синтезирующих клост-

ридий мы использовали предложенный Таширевым [4] восстановитель железа(II), так как он нетоксичен и быстро (10-15 сек) снижает редокс-потенциал (ОВП, Eh) до -150 мВ.

Целью нашей работы было выделение из природной аэробно-анаэробной ассоциации де-структоров крахмала репрезентативных культур водородобразующих бактерий рода *Clostridium* и оптимизация условий их выращивания на жидких и твердых питательных средах.

Материалы и методы. Для выделения водородобразующих штаммов *Clostridium* получали ассоциации микроорганизмов в картофельном заторе, как описано в работе [2]. Почву и нарезанный неочищенный картофель выдерживали 10 мин на водяной бане при 100 °С, инкубировали в термостате при 30 °С, а затем вносили в стеклянные флаконы с питательной средой. Для культивирования использовали флаконы объемом 100 мл с резьбой на горловине. Их герметично закрывали с помощью эластичных резиновых пробок или металлических колпачков (с отверстием диаметром 3-7 мм в центре для отбора проб газа и культуральной жидкости с помощью шприца). Все последующие культивирования проводили при 30 °С. Ассоциацию микроорганизмов культивировали на двух жидких питательных средах.

Крахмальная среда №1 (г/л): крахмал пищевой – 10,0; K_2HPO_4 – 2,5; KH_2PO_4 – 0,5; NH_4Cl – 2; Na_2SO_4 – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,5; пептон – 0,5; дистиллированная вода – 1000 мл; pH=7,1-7,3. Заваренный крахмал, пептон и дрожжевой экстракт стерилизовали отдельно при 0,5 атм (20 мин), минеральные соли – при 1,5 атм (20 мин). Для контроля ОВП в среде использовали резазуринат натрия, который вносили в количестве 1 мл/л (0,1% раствор). При Eh ≤ -50 мВ фиолетово-красный резазурин переходит в форму ярко красно-розового резорурфина, а при Eh ≤ -100 мВ образует бесцветную форму – лейкорезорурфин. Для колориметрического измерения pH в среду вносили 3,6 мл/л 0,0005% раствора бромтимолового синего. При pH ≤ 6 индикатор имеет желто-оранжевый цвет, при pH = 7 – переходит в зелёный, а при pH > 7,5 и выше – в сине-зелёный и далее синий цвет.

Среда с нативным картофелем (г/л): нативный картофель – 143,0; K_2HPO_4 – 2,5; KH_2PO_4 – 0,5; NH_4Cl – 2; Na_2SO_4 – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,2; дистиллированная вода – 1000 мл; pH=7,1-7,3; резазурин – 1 мл 0,1% раствор; бромтимоловый синий – 3,6 мл 0,0005% раствор. Нативный картофель стерилизовали методом двукратной стерилизации. Для этого герметично закрытые флаконы с сырым (нативным) картофелем, дистиллированной водой и резазурином 10 мин выдерживали на кипящей водяной бане. После 24 ч инкубации при 30 °С повторно кипятили на водяной бане 5 мин и снова инкубировали при 30 °С. Отсутствие роста микроорганизмов и обесцвечивания резазурина в течение 3-5 суток свидетельствовали о стерилизации картофеля.

Изолированные колонии клостридий в анаэробном состоянии выделяли на четырёх агаризованных средах (агар – 15 г/л): 1) агаризованная среда №1, 2) среда с тёртым картофелем (отжатая мякоть картофеля – 300 г/л), 3) среда с картофельным пюре «Мивина» (сухое пюре – 30 г/л) и 4) картофельный агар. Минеральные соли, те же что и в крахмальной среде №1, вносили в первые три среды; дрожжевой экстракт и пептон – в первые две среды; резазурин – во все четыре среды. Стерилизацию компонентов среды проводили, как описано для крахмальной среды №1.

Изолированные колонии клостридий по методу Штурм выделяли на крахмальной агаризованной среде №2 (агар – 15 г/л). Последующую реинкубацию колоний проводили с использованием крахмальной среды №2. Состав среды (г/л): крахмал пищевой – 10,0; K_2HPO_4 – 6,0; NH_4Cl – 2,0; Na_2SO_4 – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,5; пептон – 0,5; дистиллированная вода – 1000 мл; резазурин – 1 мл (в жидкой среде) и 4 мл (в агаризованной среде) 0,1% раствора; бромтимоловый синий (в агаризованную среду не вносили) – 3,6 мл 0,0005% раствор; pH=8,4-8,6. Стерилизацию компонентов среды проводили, как описано для крахмальной среды №1. Необходимость высокого значения pH среды обусловлена тем, что pH восстановителя в хелатированной форме составляет 5,0-5,1, и при его внесении (300-600 мг/л в пересчёте на катион Fe^{2+}) pH среды снижается до нейтральных или слабощелочных значений 7,2-7,4.

Восстановитель сероводород получали в стеклянных флаконах объемом 50 мл с резьбой на горловине следующим образом: флакон №1 на ½ высоты заполняли насыщенным раствором Na_2S , а флакон №2 – сухой лимонной кислотой. Флаконы продували 10 мин аргоном под ватно-марлевыми, затем закрывали эластичными резиновыми пробками, которые фиксировали металлическими фиксаторами с отверстиями в центре. Проколов иглой пробку, отбирали 2,0 мл Na_2S и вкалывали его во флакон с лимонной кислотой. В результате реакции нейтрализации получали 40 мл H_2S . Сероводород отбирали шприцем с резиновой прокладкой на поршне.

Последовательность операций посева клостридий в модифицированном методе Штурм была следующей: в стеклянные флаконы объемом 100 мл с ватно-марлевыми пробками вносили по 40 мл крахмальной агаризированной среды №2 и помещали на водяную баню (45-55 °С). Выделение микроорганизмов проводили методом 6-7 последовательных десятикратных разведений инокулята из флаконов, где происходило сбраживание картофеля или крахмала водородобразующей ассоциацией. В контрольном варианте во флакон инокулят не вносили. В среду вносили восстановитель Fe^{2+} , перемешивали её до обесцвечивания резазурина ($Eh \leq -100$ мВ) и вносили в крышку чашки Петри. После внесения среды у краев крышки помещали 3 стеклянные цилиндра ($d = 4$ мм; $l = 10$ мм). Щель между крышкой и чашкой заполняли стерильной смесью вазелинового масла и парафина (вазпаром) в объемном соотношении 1:1.

Рабочий раствор восстановителя Fe^{2+} готовили следующим образом: во флакон объемом 30 мл с резьбой на горловине под ватно-марлевой пробкой вносили 2,0 г двузамещенного цитрата натрия ($C_6H_5O_7Na_2 \cdot 1,5 H_2O$) и 2,0 г железа (II) в виде $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (20 г/л в пересчете на катион Fe^{2+}). Содержимое продували аргоном 20 мин, а затем, не прекращая продувки, вносили 20 мл дистиллированной воды и продували еще 10 мин. Далее флакон закрывали пенициллиновой пробкой и навинчивали алюминиевый колпачок с отверстием ($d=5$ мм) в центре для отбора восстановителя с помощью шприца. Проколов иглой резиновую пробку, во флакон подавали аргон до избыточного давления 0,4-0,5 атм и стерилизовали 10 мин на водяной бане при 100° С.

Газово-хроматографический анализ проводили, как описано в работе [2].

Результаты и их обсуждение. Ассоциация споровых бактерий (*Bacillus* и *Clostridium*) получена методом пастеризации. Поэтому она не содержит физиологических групп микроорганизмов, потребляющих H_2 и снижающих его концентрацию в газовой фазе (денитрифицирующие, азотфиксирующие, ацетогенные, сульфатвосстанавливающие, метанобразующие и др.). Кроме того, при контаминации споровой ассоциации нежелательными видами микроорганизмов, от них можно легко избавиться повторной пастеризацией.

Такую ассоциацию мы получили в картофельном заторе, который обычно используется для получения накопительной культуры маслянокислых бактерий. Селективные условия для роста клостридий создавали следующим образом:

- 1) использованием крахмала картофеля, как источника углерода, доступного только для микроорганизмов, содержащих амилолитические ферменты (α - и β -амилаза, глюкоамилаза, пуллуланаза и др.);
- 2) пастеризацией, которая обеспечивала выживание только клостридий, сбраживающих крахмал с образованием H_2 ;
- 3) созданием анаэробных условий (отсутствие O_2 – конкурентного терминального акцептора электронов).

С целью сбора газа в пробирке ватно-марлевою пробку на третьи сутки заменили резиновой. Через 2,5 часа провели газово-хроматографический анализ для подтверждения того, что синтезированный газ содержит H_2 . Проколов иглой шприца пробку, отбирали пробы. Концентрация водорода в газовой фазе в различных вариантах составляла 2,0-6,4 %.

Мы считаем, что балансовые эксперименты лучше проводить на синтетических или полусинтетических средах. Для этого ассоциацию пересевали на жидкие полусинтетические среды с а) крахмалом и б) нативным картофелем. Синтез газа при сбраживании двух субстратов происходил в течение 9-11 и 13-15 суток, соответственно. Концентрация H_2 составляла от 18 до 55 % и от 15 до 54 %, соответственно.

Выделение изолированных колоний на поверхности агаризированной среды является важной задачей работы, так как их морфологическое описание необходимо для идентификации выделенных штаммов. Поэтому вначале мы выбрали способ культивирования в анаэростатах. Однако в коммерческих анаэростатах газогенерирующие пакеты не обеспечивают полное удаление кислорода. Для культивирования облигатно-анаэробных микроорганизмов, кроме удаления O_2 из среды, также необходимо создание отрицательных значений ОВП ($Eh \leq -100$ мВ). Общепринято, что для роста облигатно анаэробных бактерий достаточным является ОВП -150 мВ. Этого можно достичь внесением такого восстановителя, как H_2S в среду или газовую фазу. Однако конструкция большинства поликарбонатных анаэростатов не позволяет технически внести в него сероводород. Поэтому мы использовали недорогой, но надёжный стеклянный анаэростат.

Воздух из него удаляли трёхкратным вакуумированием с последующим внесением аргона. Удаление следов O_2 и снижение ОВП в питательной среде достигалось внесением в газовую фазу H_2S . Известно, что H_2S , как и другие восстановители, в зависимости от их дозы, оказывают токсический эффект на бактерии. Так, одни клостридии могут расти в широком диапазоне концентраций H_2S , для других – даже следовые его количества подавляют их рост.

Изолированные колонии клостридий вначале выделяли на агаризованной среде №1 как среде наиболее известного состава. В результате многократных экспериментов мы выяснили следующее: в концентрации от 1 до 1,8 % H_2S создавал в среде необходимый потенциал -150 мВ (резазурин оставался бесцветным в течение 10-15 суток). Однако клостридии на поверхности среды не росли. При уменьшении концентрации H_2S от 1 до 0,65% – клостридии также не росли, так как в среде не создавалось необходимое для их роста значение ОВП (резазурин оставался окрашенным в розовый цвет или был бесцветным всего 1 сутки). Мы предположили, что в указанном концентрационном диапазоне, H_2S токсичен для клостридий, а поэтому непригоден для их выделения на агаризованной среде №1. Поэтому мы проверили возможность роста на средах сходных по составу к нативному картофелю: среда с тёртым картофелем, среда с картофельным пюре «Мивина» и картофельный агар. Однако и в этом случае рост клостридий отсутствовал. Это является подтверждением того, что отсутствие роста клостридий обусловлено токсическим действием на них H_2S . Поэтому мы отказались от культивирования клостридий в анаэроstate в атмосфере аргона с добавлением сероводорода.

Далее мы изучили возможность применения метода Штурм для выделения H_2 -образующих клостридий. Достоинствами метода являются: 1) доступность, 2) проста в работе и 3) эффективность для культивирования облигатных анаэробов. Существенными недостатками оригинального метода, первые два из которых обусловлены выливанием среды с крышки при неравномерном накрывании её чашкой, являются: 1) невозможность создания фиксированного объема и слоя среды; 2) сложность соблюдения стерильности; 3) непригодность парафина для герметизации щели между крышкой и чашкой.

Для устранения недостатков, а также усовершенствования метода для выделения H_2 -образующих клостридий, мы осуществили следующие модификации:

1. Стандартизация толщины слоя и объёма среды: после внесения бактериального агара (бактагар: среда с инокулюмом) у краев крышки помещали 3 стеклянные цилиндра, благодаря которым среда не выливалась и имела фиксированную высоту, равную их диаметру. При диаметре цилиндра 4 мм объём среды был 40 мл.

2. Использование вазпара для герметизации: благодаря своей коллоидной структуре он сочетает в себе преимущества своих составляющих и лишён их недостатков. Так, окисляющий среду O_2 воздуха диффундирует через пористую структуру парафина, а сквозь вазелиновое масло он может проникнуть путем конвекции. Вазпар надёжно защищает среду от контакта с O_2 . Поскольку после застывания крахмальный агар и вазпар сходны по цвету (бело-матовые), для их контрастирования и обнаружения щелей при заливке, вазпар целесообразно подкрашивать неполярными красителями (например, судан III). Рост колоний в камерах из чашек можно наблюдать в течение длительного периода времени (более 1 месяца), не нарушая целостности таких камер.

3. Выбор восстановителя: наиболее подходящим жидким восстановителем для культивирования анаэробных микроорганизмов является Fe^{2+} . Преимущества соединений железа (II) следующие: 1) в рабочих (эффективных) концентрациях не токсичны для бактерий, 2) очень быстро поглощают следы O_2 из газовой фазы и питательной среды: в нейтральных условиях редокс-равновесие в -150 мВ устанавливается уже через 10-15 сек; 3) препараты Fe^{2+} ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ (соль Мора)) являются дешевыми и удобными в технике культивирования анаэробов. В нейтральных и слабощелочных условиях катион Fe^{2+} образует нерастворимые соединения ($Fe(OH)_3$, $FeCO_3$, $FeHPO_4$). Поэтому для стабилизации катиона Fe^{2+} мы хелатировали его двухзамещенным цитратом натрия. При приготовлении этого комплексного соединения, необходимо соблюдать молярное соотношение ионов железа и цитрата 1:1,5. Экспериментально установлено, что железом(II) сульфат (300-600 мг/л Fe^{2+}) не угнетал рост исследуемых клостридий, обеспечивал достаточный для облигатных анаэробов величину ОВП и необходимую редокс-буферную ёмкость. Использование железа как восстановителя также повышает активность гидрогеназы, ответственную за образование H_2 . Известно, что в актив-

ном центре этого фермента содержится уникальный биметаллический (Fe-Fe) центр с небелковыми лигандами (CO, CN) [8].

4. Корректировка pH питательной среды: при использовании крахмальной среды № 1 мы столкнулись с проблемой значительного снижения её pH (до 3,9-4,0) при внесении кислого раствора (pH 5,0-5,1) восстановителя. При этом рост клостридий отсутствовал. Для стабилизации нейтральных значений pH (7,2-7,4) использовали крахмальную агаризированную среду №2, в которой, по сравнению с предыдущей средой, был убран кислый KH_2PO_4 , и была увеличена до 6 г/л концентрация щелочного K_2HPO_4 .

5. Определение факторов роста: для этого выделение клостридий проводили на трёх вариантах среды: по 0,2 г/л, по 0,5 г/л и без добавления дрожжевого экстракта и пептона. В разведениях с первого по четвертое, во всех вариантах на первые сутки был рост газом. С пятого по седьмое разведение при отсутствии факторов роста визуально рост колоний наблюдали на вторые сутки. Добавление факторов роста стимулировало рост клостридий, и визуально рост колоний наблюдали уже на 17-20 ч роста.

Колонии H_2 -образующих клостридий отбирали по способности к гидролизу крахмала и образованию газа. Визуальными признаками этих процессов было появление светлого кольца вокруг колонии и отрицательная йодокрахмальная реакция кольца, а также образование газовых пузырьков и разрывов агара в зоне роста колоний (рис.1).

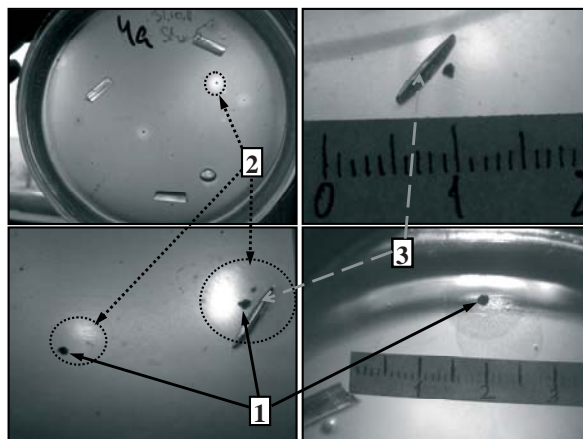


Рис.1. Рост изолированных колоний водородобразующих штаммов *Clostridium* на крахмальной агаризированной среде №2 по оптимизированному методу Штурм: 1 – отдельные колонии; 2 – светлые зоны гидролиза крахмала; 3 – газовые разрывы в зоне роста колоний.

Для доказательства выделения H_2 -образующих колоний клостридий определяли состав газовой фазы в чашках. Для этого отбирали чашку, где было обильное образование газовых разрывов среды. В такой чашке вазпар давлением выдавливался из щели, и под ним образовывался газовый пузырь. Из него отбирали 2,5 мл газа для газовой хроматографической анализа. Концентрация H_2 составляла больше 6 %.

Для проверки чистоты культуры и дальнейших физиологических исследований колонии переносили на жидкую среду. Для этого дно чашки снимали, стерильным шпателем вырезали агаровый блок с колонией и переносили во флакон с крахмальной средой №2. Флакон продували аргоном, герметично закрывали и шприцем вносили железо(II) в концентрации 400 мг/л. Известно, что рост клостридий в первые сутки сопровождается активным образованием кислот: уксусной, масляной, пропионовой и др. [6]. Поэтому на 1-2 сутки роста мы отмечаем изменение цвета pH-индикатора бромтимолового синего с сине-зелёного на жёлто-оранжевый. Это свидетельствовало о снижении pH как минимум до 6,0. Для более точного определения pH использовали индикатор метиловый красный (переход окраски от красной к жёлтой при pH=4,4-6,2). При добавлении к отобранной шприцем пробе культуральной жидкости индикатора, его окраска изменялась на красную, а в некоторых вариантах на пурпурную, что свидетельствовало о снижении значений pH до 4,4 и ниже. Для корректировки pH на уровне 6,5-7,5,

шприцем вносили 1 М стерильный раствор натрия карбоната. Последовательную реизоляцию с жидкой на агаризованную среду проводили трижды. Во втором и третьем пассажах наблюдался рост морфологически одинаковых колоний: белые неправильные или древовидные, диаметр 0,4-2 мм.

Результаты микроскопических исследований свидетельствуют о том, что клетки выделенного штамма H_2 -образующих кластридий грамположительные, прямые палочки с закругленными концами размером 0,8-1x2,5-3,1 мкм; с центральными овальными спорами (рис. 2). Рабочее название штамма – *Clostridium* sp. ВУ-11. При росте штамма в жидкой среде на протяжении 3 пассажей определены количественные показатели синтеза водорода и сбраживания крахмала (рис. 3). Максимальная концентрация H_2 в газовой фазе 49 %, а средняя – 37 %. Из 1 кг крахмала штамм синтезировал 128 л H_2 , время деструкции крахмала – 6 суток; коэффициент деструкции (уменьшение массы крахмала) – 7.

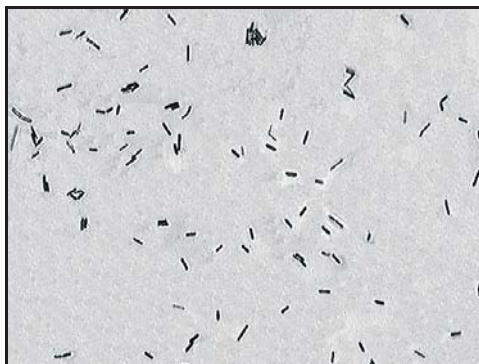


Рис. 2. Морфология окрашенных по Граму клеток штамма *Clostridium* sp. ВУ-11 при росте на крахмальной среде №2 (x1500).

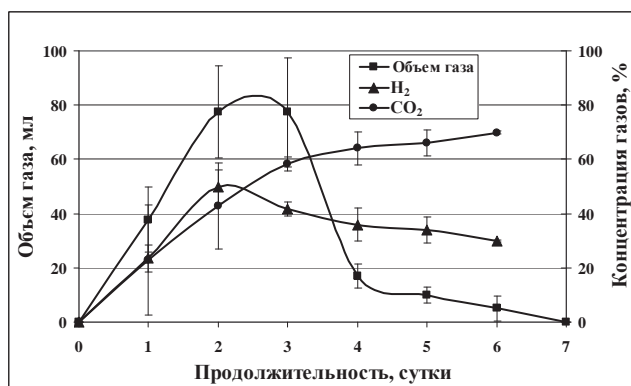


Рис. 3. Динамика синтеза газа и состава газовой фазы при росте штамма *Clostridium* sp. ВУ-11 на крахмальной среде № 2.

Таким образом, в данной работе, на основе метода Штурм усовершенствован метод выделения чистых культур и количественного учета облигатно-анаэробных бактерий. Выделен штамм H_2 -образующих бактерий *Clostridium* sp. ВУ-11, который при росте на полусинтетической среде с крахмалом образует до 49 % H_2 . Следующим этапом работы будет идентификация выделенного штамма с помощью классических культурально-морфологических и молекулярно-генетических методов. Фундаментальный аспект исследования H_2 -образующих видов бактерий заключается в количественной оценке их участия в глобальных циклах H_2 и углерода. Выделение и изучение типовых штаммов H_2 -образующих кластридий является необходимым для направленной регуляции синтеза H_2 в технологических процессах с помощью ассоциации *Bacillus* и *Clostridium* или чистых культур кластридий. Полученные результаты являются основой для создания промышленной биотехнологии получения энергоносителя – водорода при обезвреживании экологически опасных твердых пищевых отходов путем их сбраживания ассоциацией бактерий *Bacillus* и *Clostridium*.

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ ВОДЕНЬУТВОРЮЮЧИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *CLOSTRIDIUM*

Резюме

Удосконалено метод виділення та кількісного обліку чистих культур облигатно-анаеробних воденьутворюючих клостридій. З асоціації спороутворюючих бактерій виділено штам воденьутворюючих бактерій *Clostridium* sp. ВУ-11. При рості штаму в рідкому середовищі визначені кількісні показники синтезу водню і зброджування крохмалю. Концентрація H_2 в газовій фазі - 49%, з 1 кг крохмалю мікроорганізми синтезували 128 л H_2 , за 6 діб маса крохмалю зменшувалася у 7 разів. Зазначені показники синтезу водню і зброджування крохмалю, а також в подальшому інших модельних органічних субстратів є основою для створення промислової біотехнології отримання енергоносія - водню при знешкодженні екологічно небезпечних твердих харчових відходів.

К л ю ч о в і с л о в а: біотехнології синтезу енергоносіїв, воденьутворююча асоціація, *Clostridium* sp., техніка анаеробіозу

I.P. Pritula, A.B. Tashyrev

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

IMPROVEMENT OF THE METHOD OF ISOLATION OF HYDROGEN- FORMING BACTERIA OF *CLOSTRIDIUM* GENUS

S u m m a r y

The method of isolation and quantitative account of pure cultures of obligate anaerobic hydrogen-forming clostridia is improved. A strain of hydrogen-forming bacteria *Clostridium* sp. ВУ-11 has been isolated from the association of sporulating bacteria. Quantitative indices of hydrogen synthesis and starch fermentation have been determined when growing the strain in the liquid medium. Concentration of H_2 in the gas phase was 49%, microorganisms synthesized 128 l of H_2 from 1 kg of starch, the mass of starch decreased 7 times for 6 days. The mentioned indices for hydrogen synthesis and starch fermentation and for other organic model substrates in the future are the basis for creating the industrial biotechnology for production of hydrogen as the energy carrier under disposal of ecologically dangerous solid food waste.

The paper is presented in Russian.

Key words: biotechnology of synthesis of energy carriers, hydrogen-forming association, *Clostridium* sp., anaerobiosis technique.

The authors' address: Pritula I.P., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. *Методы выделения и культивирования // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов.* – Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СРСР, 1978. – С. 7–45.
2. *Матвеева Н.А., Левишко А.С., Прутула І.Р., Таширеєв А.А., Рокитко П.В., Таширеєв А.Б.* Образование молекулярного водорода ассоциацией спорообразующих микроорганизмов // *Мікробіологічний журнал.* – 2011. – **73**, № 1. – С. 36–43.
3. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Учебное пособие / Под. ред. Н.П. Елинова* – Москва: Медицина, 1988. – 208 с.
4. *Таширеєв О.Б.* Біотехнології очищення промислових стічних вод на основі термодинамічного прогнозування взаємодії мікроорганізмів з металами та радіонуклідами: Автореф. дис. ... д-ра техн. Наук. – Київ, 2005. – 33 с.
5. *Das D., Veziroglu T.N.* Hydrogen production by biological processes: a survey of literature // *Int. J. Hydrog. Energy.* – 2001. – **26**, N 1. – P. 13–28.
6. *Ntaikou I., Antonopoulou G., Lyberatos G.* Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review // *Waste Biomass Valor.* – 2010. – **1**, N 1. – P. 21–39.
7. *Sen U.K., Shakhwapee M., Banerjee R.* Status of biological hydrogen production // *Journal of scientific and industrial research.* – 2008. – **67**, N 11. – P. 980–993.
8. *Das D., Dutta T., Nath K., Kotay S.M., Das A.K., Veziroglu T.N.* Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production // *Current science.* – 2006. – **90**, N 12. – P. 1627–1637.

Отримано 16.09.2011