

УДК 579.852.11/.13+579.6

© 2015

*О.Б. Таширеву,**доктор  
технічних  
наук**І.Р. Притула**Г.О. Таширева,**кандидат  
біологічних  
наук**Інститут  
мікробіології  
і вірусології  
імені Д.К. Заболотного  
НАН України*

## **ІДЕНТИФІКАЦІЯ СПОРОВІРНИХ БАКТЕРІЙ В АСОЦІАЦІЯХ ВОДЕНЬУТВОРЮВАЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ**

**Мета.** Встановити видовий склад споротвірних бактерій асоціацій воденьутворювальних мікроорганізмів для оцінки можливості їх біотехнологічного застосування.

**Методи.** Фенотиповий та філогенетичний аналіз, хіміко-аналітичний метод, газова хроматографія.

**Результати.** У складі всіх досліджених асоціацій переважають *Bacillus* та *Clostridium*. За морфологічними, культурально-біохімічними та молекулярно-генетичними характеристиками ідентифіковано до виду 3 штами. Штам анаеробних бактерій ідентифікований як *Clostridium butyricum* ВУ-11, штами аеробних бактерій — як *Bacillus licheniformis* BS-3 та *Bacillus atrophaeus* BS-4. **Висновки.** Бациллярно-кlostридіальні асоціації є перспективними для рентабельного синтезу енергоносія  $H_2$  із широкого спектра поновлювальної біомаси, зокрема харчових відходів.

**Ключові слова:** водень, асоціації воденьутворювальних мікроорганізмів, ідентифікація, *Clostridium*, *Bacillus*.

Молекулярний водень як альтернативний енергоносіє має низку технологічних, соціально-економічних та екологічних переваг над викопним паливом і є його найкращою альтернативою [6, 7]. Серед усіх методів отримання  $H_2$  темною ферментацією (збродження) вважають найоптимальнішим процесом, адже вона забезпечує технологічно простий метод без значних енергозатрат і дає змогу утилізувати найрізноманітніші органічні відходи [9]. Бактерії, що зброджують органічні сполуки з утворенням  $H_2$ , дуже поширені в природних (ґрунт, коров'ячий гній, пташиний послід) та техногенних (збродження осад метантенку, активний мул аеротенку) угрупованнях [12, 14]. Застосування селективних факторів — пастеризації чи кип'ятіння — забезпечує селекцію термостабільних споротвірних бактерій, що синтезують  $H_2$  [14]. Так, раніше нами з ґрунту було виділено асоціацію споротвірних бактерій, що за 7 діб синтезувала 120 л  $H_2$ /кг абсолютно сухої маси (АСМ) картоплі і зменшувала її масу в 17 разів [1]. Надалі ми розширили

спектр досліджуваних біотопів і виділили асоціації воденьутворювальних мікроорганізмів також зі збродженого осаду метантенку та активного мулу аеротенку [3, 14].

**Мета досліджень** — встановлення видового складу споротвірних бактерій асоціацій воденьутворювальних мікроорганізмів для оцінки можливості їх біотехнологічного застосування.

**Матеріали і методи досліджень.** Досліджували аеробні та анаеробні споротвірні бактерії асоціацій. Виділення двох штамів аеробних бактерій та вивчення їхніх морфологічних властивостей проводили в чашках Петрі на середовищі № 1 (табл. 1) [3]. Штам анаеробних бактерій виділено у товщі агаризованого середовища за вдосконаленим методом Штурма [4]. Проте для видової ідентифікації необхідний морфологічний опис колоній на поверхні агаризованого середовища. Для цього бактерії культивували в чашках Петрі на середовищі № 2 (див. табл. 1) в анаеростаті в атмосфері аргону та з використанням відновника заліза (II).

Для нарощування біомаси клітин анаеробних та аеробних бактерій з метою подальшого виділення ДНК їх культивували у скляних флаконах об'ємом 30 мл (середовища № 3 та № 4 відповідно; див. табл. 1). Для виділення ДНК використовували клітини в експоненціальній фазі росту (24–36 год культивування). Для анаеробного штаму флакони закривали еластичними гумовими пробками та герметизували їх металевими фіксаторами. Аеробні бактерії культивували у пробірках з ватно-марлевими пробками.

Для визначення виду бактерій використовували культурально-біохімічні тести, рекомендовані у посібнику з систематики бактерій [8], у роботі О.Н. Рєви та ін. [13], а також секвенування генів 16S рРНК. Для ампліфікації послідовностей генів 16S рРНК використовували універсальний для більшості еубактерій праймер 27f. Біохімічні тести для бактерій досліджували згідно з методиками [2]. Для цього анаеробний штам культивували в пробірках з гумовими пробками, а посів проводили уколом чи внесенням суспензії з подальшим продуванням аргонном (10 хв). Аеробні бактерії культивували у пробірках з ватно-марлевими пробками.

Виділення геномної ДНК та визначення нуклеотидних послідовностей анаеробного

штаму було проведено співробітниками Лімнологічного інституту Сибірського відділення РАН (Іркутськ) [5]. Виділення ДНК штамів аеробних бактерій проведено разом зі співробітниками Інституту клітинної біології та генної інженерії НАН України (Київ) згідно з протоколами [10, 11] з модифікаціями. Нуклеотидні послідовності аеробних бактерій визначали в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України. Для філогенетичного аналізу обчислювали попарну спорідненість (%) нуклеотидних послідовностей генів 16S рРНК виділених штамів із депонованими в базі даних GenBank (програма BLAST). Методом об'єднання найближчих сусідів будували дендрограми, де визначено положення штамів серед близькоспоріднених і типових видів [5].

Дослідження утворення  $H_2$  анаеробним штамом проводили в стаціонарних умовах у герметичних флаконах об'ємом 120 мл з рідким середовищем № 1. Суворі анаеробні умови створювали за допомогою продування середовища аргонном і внесенням відновника заліза (II) [4]. Склад газу, що синтезувався під час зброджування крохмалю, визначали за стандартною методикою за теплопровідністю катарометра на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД [1]. Об'єм синтезованого газу вимірювали за шкалою шприца під час видавлювання поршня надлишковим

**1. Склад живильних середовищ для культивування штамів анаеробних та аеробних споротвірних бактерій (температура культивування 30°C)**

Компонент середовища		Середовище, вміст компонентів, г/л дистильованої води			
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Основне джерело вуглецю	Крохмаль	10	10	0	0
	Глюкоза	0	0	20	20
Мінеральні солі	$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	2,5	6,0	6,0	2,5
	$KH_2PO_4$	0,5	0	0	0,5
	$NH_4Cl$	2,0	2,0	2,0	2,0
	$Na_2SO_4$	0,5	0,5	0,5	0,5
Фактори росту	Дріжджовий екстракт	0,5	0,5	1	1
	Пелтон	0,5	0,5	1	1
Ен-індикатор резазурин, мл/л 0,1%-го водного розчину		0	4	4	0
Відновник заліза (II) (у перерахунку на $Fe^{2+}$ ) та атмосфера $Ar$		0	0,4–0,6	0,4–0,6	0
Агар		15	25	0	0
pH		7,1–7,3	6,6–7,4	6,6–7,4	7,1–7,3

**2. Порівняльний аналіз попарної спорідненості досліджуваних штамів з представниками *Clostridium* та *Bacillus* у базі даних GenBank, %**

Штам	Найближчі види	
	Вид, № штаму (GenBank accession №)	% спорідненості
BY-11	<i>C. butyricum</i> VPI3266 (NR_042144.1)	98,6
	<i>C. roseum</i> 653 (NR_029354.1)	97,67
	<i>C. diolis</i> SH1 (NR_025542.1)	97,5
	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4 (NR_036950.1)	97,5
BS-3	<i>B. licheniformis</i> DSM13=ATCC14580 (NR_074923)	98,93
	<i>B. sonorensis</i> NRRL B-23154 (NR_025130.1)	98,2
	<i>B. aerius</i> 24K (NR_042338.1)	97,88
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 (NR_102783.1)	96,9
BS-4	<i>B. atrophaeus</i> 1942 (NR_075016.1)	99,6
	<i>B. amyloliquefaciens</i> NBRC15535 (NR_041455)	99,6
	<i>B. atrophaeus</i> JCM9070 (NR_024689.1)	99,6
	<i>B. vallismortis</i> DSM 11031 (NR_024696.1)	99,5

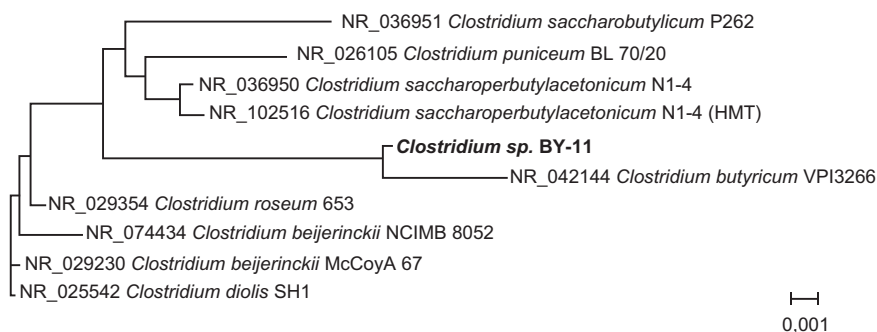
тиском газу. Об'єм і склад газу визначали щодоби. Коефіцієнт деструкції ( $K_d$ ) розраховували як  $m_1:m_2$ , де  $m_1$  і  $m_2$  — початкова та кінцева АСМ субстрату. Тривалість бродіння (Т) визначали як час, протягом якого відбувалося газоутворення.

**Результати досліджень.** Для визначення видової належності штамів споротвірних бактерій досліджено морфологічні, культурально-біохімічні та молекулярно-генетичні характеристики.

**Характеристики анаеробного штаму.** Колонії 1–3 мм у діаметрі, від круглих до неправильної форми, з хвилястим, лопатевим або нерівним краєм; від плато-подібних до піднятих чи опуклих; блискучі, непрозорі, білі, гладенькі, з гранульованою

чи крапчастою внутрішньою структурою; із характерним запахом оцтової та масляної кислот. Клітини — прямі палички із округленими кінцями, рухливі; грам-позитивні; 0,8–1,0 × 2,5–3,1 мкм, поодинокі, в парах, у коротких або довгих ланцюжках. Спори овальні, від центральних до субтермінальних, не роздувають клітину.

Штам гідролізував крохмаль, не утворював  $H_2S$  під час росту в м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ), індол, аміак, лецитиназу та ліпазу, не відновлював нітрати до нітритів; реакція на каталазу негативна. Реакція з молоком — пептонізація та утворення сироватки. Гідролізував ескулін. З утворенням кислоти зброджував арабінозу, целобіозу, фруктозу, галактозу, глікоген, лактозу, мальтозу, манозу,



**Рис. 1.** Філогенетичне дерево, де видно положення штаму *Clostridium* sp. BY-11 серед близько-споріднених і типових видів *Clostridium*. Масштаб відповідає 1-й заміні на 1000 п.н.

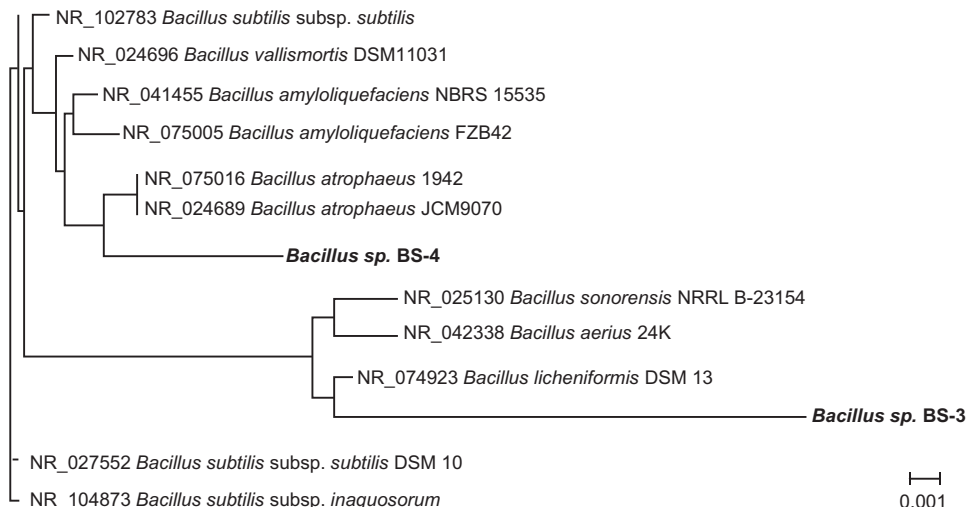


Рис. 2. Фрагмент філогенетичного дерева, де видно положення штамів BS-3 та BS-4 серед близькоспоріднених і типових видів *Bacillus*. Масштаб відповідає 1-й заміні на 1000 п.н.

мелібіозу, рафінозу, рибозу, саліцин, сахарозу, трегалозу, ксилозу та пектин. Не зброджував інозит, інулін, маніт, рамнозу та сорбіт. Досліджені морфолого-культуральні ознаки дають змогу зарахувати цей штам до роду *Clostridium*.

Для уточнення таксономічного статусу штаму *Clostridium* sp. ВУ-11 нами використано сиквенс генів 16S рНК. Порівняльний аналіз попарної спорідненості свідчить, що найбільш близькоспорідненим видом для досліджуваного штаму є *Clostridium butyricum* — 98,6% спорідненості (табл. 2).

Додатково філогенетичне положення підтверджували побудовою дендрограми. Так, штам ВУ-11 має високу схожість з *C. butyricum* VPI3266 і на дендрограмі (рис. 1) утворює з ним спільний кластер. Отже, штам ВУ-11 ідентифіковано як *C. butyricum*.

**Характеристики аеробних штамів.** Колонії штаму BS-3 неправильної форми,  $d=1-4$  мм, з хвилястим краєм, припідняті, білі, матові, в'язкі (тягнуться за петлею). Колонії штаму BS-4 неправильної форми,  $d>5-10$  мм, з нерівним краєм, припідняті, білі чи напівпрозорі, матові чи блискучі, в'язкі. Колонії штамів мають характерний різкий запах. Клітини штамів грампозитивні; прямі палички із заокругленими кінцями; рухомі; розташовані поодинокі або у диплобацилах чи ланцюжках по 3–5 клітин. Спори — центральні, еліптичні, не

роздувають клітину. Розміри клітин штаму BS-3 —  $0,8-0,9 \times 1,3-2,4$  мкм, штаму BS-4 —  $0,9-1,0 \times 2,0-2,1$  мкм. Обидва штами гідролізували крохмаль; були здатні до анаеробного росту в м'ясо-пептонному агарі (МПА); зброджували глюкозу з утворенням кислоти, але не ацетоїну; каталазопозитивні; відновлювали нітрати, але не утворювали  $N_2$ ; гідролізували казеїн, желатин та ескулін; росли в МПБ за 7% NaCl та використовували цитрат. Крім того, штам BS-3 оксидазопозитивний та ріс у МПБ за  $50-55^\circ\text{C}$ . Окислював з утворенням кислоти арабінозу, целобіозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, манітол, манозу, рибозу, сахарозу, трегалозу та пектин. Не використовував глікоген, інулін, мелібіозу, рафінозу, рамнозу та ксилозу; слабке утворення кислоти було виявлено за використання інозиту, лактози, саліцину та сорбіту. Штам BS-4 оксидазонегативний і не ріс у МПБ за  $50-55^\circ\text{C}$ . Окислював з утворенням кислоти лише фруктозу, мальтозу, сахарозу та пектин. Слабке утворення кислоти було виявлено за використання целобіози, манози, саліцину, сорбіту та трегалози; решту цукрів не використовував. Досліджені морфолого-культуральні ознаки дають змогу зарахувати ці штами до роду *Bacillus*.

Порівняльний аналіз попарної спорідненості свідчить, що найбільш близькоспоріднений вид для штаму BS-3 — *B. licheniformis* (98,93%) (див. табл. 2). Для штаму BS-4

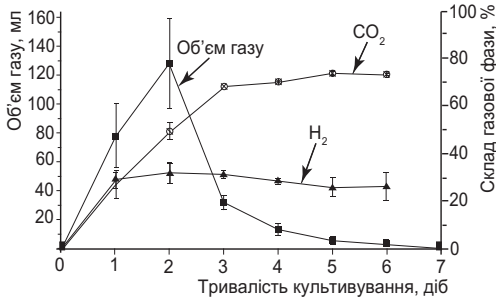


Рис. 3. Динаміка утворення H<sub>2</sub> під час збродження крохмалю *C. butyricum* ВУ-11

отримано неоднозначний результат. Філогенетичне положення штамів уточнювали під час побудови дендрограми (рис. 2). Отже, штам BS-3 ідентифіковано як *B. licheniformis*, а штам BS-4 як *B. atrophaeus*.

Утворення H<sub>2</sub> анаеробним штамом ВУ-11 було підтверджено ще на етапі його виділення в товщі агаризованого середовища з крохмалем (H<sub>2</sub>>6%) [4], а також під час культивування в анаеростаті (H<sub>2</sub> = 10–17%). Тому доречним було дослідити утворення H<sub>2</sub> вже ідентифікованим штамом *C. butyricum* ВУ-11 під час збродження модельного субстрату крохмалю (0,7 г) у рідкому

середовищі № 1 (рис. 3). Середня максимальна концентрація H<sub>2</sub> становила 31±4,5% на 2-гу добу. За 6±0,9 доби штам синтезував 110±19,8 л H<sub>2</sub> в перерахунок на 1 кг АСМ крохмалю і зменшував його масу в 7,9±2,7 раза.

Отже, на основі видового складу та властивостей споротвірних бактерій асоціації воденьутворювальних мікроорганізмів для отримання H<sub>2</sub> з відходів можна виділити такі переваги бациллярно-кlostридіальних асоціацій:

- бактерії не патогенні; прототрофні, тобто вони не потребують додаткових вартісних сполук (вітамінів, мікроелементів та ін.); мають високу швидкість метаболізму, що забезпечує ефективний синтез H<sub>2</sub>;

- можуть з утворенням H<sub>2</sub> утилізувати широкий спектр простих і складних цукрів, які є компонентами харчових відходів;

- бактерії мезофільні (25–35°C), тобто не потребують великих енерговитрат (підтримки t°) у технологічному процесі.

Також встановлено, що аеробні споротвірні бактерії асоціації під час росту знижують редокс-потенціал [3], що, очевидно, є ключовим у створенні оптимальних умов для росту точно анаеробних H<sub>2</sub>-утворювальних кlostридій під час збродження відходів асоціаціями.

## Висновки

Метадами фенотипового та філогенетичного аналізу встановлено видовий склад споротвірних бактерій асоціації воденьутворювальних мікроорганізмів. Виділений штам анаеробних бактерій ідентифікований як *Clostridium butyricum* ВУ-11, 2 аеробних штами — як *Bacillus licheniformis* BS-3 та *Bacillus atrophaeus* BS-4. Під час збродження модельного субстрату крохмалю у рідкому

середовищі *C. butyricum* ВУ-11 за 6±0,9 доби синтезує 110±19,8 л H<sub>2</sub>/кг АСМ субстрату і зменшує його масу в 7,9±2,7 раза. На основі видового складу споротвірних бактерій та їхніх властивостей встановлено, що бациллярно-кlostридіальні асоціації є перспективними для рентабельного синтезу енергоносія H<sub>2</sub> із широкого спектра поновлювальної біомаси, зокрема харчових відходів.

## Бібліографія

1. Матвеева Н.А. Образование молекулярного водорода ассоциацией спорообразующих микроорганизмов/Н.А. Матвеева [та ін.]/Мікробіол. журн. — 2011. — Т. 73, № 1. — С. 36–43.
2. Методы общей бактериологии: в 3 т./ [под ред. Ф. Герхард [и др.]. — М.: Мир, 1984. — Т. 3. — 263 с.
3. Прутула І.Р. Застосування редокс-

індикаторів для вимірювання окисно-відновного потенціалу під час росту культур мікроорганізмів/І.Р. Прутула, О.Б. Таширев// Біологічні студії/Studia Biologica. — 2013. — Т. 7, № 3. — С. 133–144.

4. Прутула І.Р. Усовершенствование метода выделения водородобразующих бактерий рода *Clostridium*/І.Р. Прутула, А.Б. Таширев//Мікробіол. журн. — 2012. — Т. 74, № 6. — С. 58–64.

5. Романовская В.О. Филогенетический анализ бактерий экстремальных экосистем/ В.О. Романовская и др.//Мікробіол. журн. — 2014. — Т. 76, № 3. — С. 2–10.
6. Choi J. Characteristics of biohydrogen fermentation from various substrates/J. Choi, Y. Ahn//Int. J. Hydrog. Energy. — 2014. — V. 39, № 7. — P. 3152–3159.
7. Das D. Advances in biological hydrogen production processes/D. Das, T. N. Veziroglu// Int. J. Hydrog. Energy. — 2008. — V. 33. — P. 6046–6057.
8. De Vos P. Bergey's manual of systematic bacteriology/P. De Vos [and others]. — New York, Springer. — 2009. — V. 3, 2d ed.
9. Liu I.-C. The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: thermodynamic and metabolic considerations/I.-C. Liu [et al.]// Int. J. Hydrog. Energy. — 2011. — V. 36, № 1. — P. 439–449.
10. Meade H.M. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis/H.M. Meade [et al.]//J. Bacteriol. — 1982. — V. 149, № 1. — P. 114–122.
11. *Miniprep* of bacterial genomic DNA. Current protocols in molecular biology [Електронний ресурс]: Режим доступу: [http://www.falw.vu/~microb/Protocols/nucleic\\_acid\\_isolation/DNA\\_isolation\\_Bacteria.pdf](http://www.falw.vu/~microb/Protocols/nucleic_acid_isolation/DNA_isolation_Bacteria.pdf)
12. Ntaikou I. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review/I. Ntaikou, G. Antonopoulou, G. Lyberatos//Waste Biomass Valor. — 2010. — V. 1. — P. 21–39.
13. Reva O.N. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype/O.N. Reva, I.B. Sorokulova, V.V. Smirnov//Int. J. Syst. Evolut. Microbiol. — 2001. — V. 51, № 4. — P. 1361–1371.
14. Tashyreva A. The novel comprehensive approach for non-food agricultural and landfill biomass microbial fermentation and biogas production/A. Tashyreva, O. Tashyrev, I. Prytula// Biotechnology and Plant Breeding Perspectives; eds. R.K. Behl, E. Arseniuk//Agrobios (International) Publishers, 2014. — P. 337–346.

Надійшла 18.12.2014.