

УДК 579.6

ПРОЛОНГИРОВАННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АНАЭРОБНОГО СООБЩЕСТВА БАКТЕРИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ВОДОРОД

© 2012 г. Б. Ф. Белокопытов, Я. В. Рыжманова, К. С. Лауринавичюс, В. А. Щербакова

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Московская обл., 142290

e-mail: shcherb@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 15.06.2011 г.

Исследованы различные способы длительного поддержания процесса выделения водорода при выращивании анаэробного сообщества бактерий на крахмалсодержащей среде. При культивировании в режиме отъемно-доливной ферментации в течение 72 сут образовывалось от 0.10 до 0.23 л H_2 /л среды/сут. Режим регулярных пересевов продолжался более 100 сут с образованием в среднем 0.81 л H_2 /л среды/сут. Выявлены достоинства и недостатки различных способов микробиологического получения водорода в темновом процессе сбраживания крахмала. Из сформированного H_2 -образующего сообщества микроорганизмов выделена анаэробная спорообразующая бактерия, штамм ВФ. Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК нового штамма показал, что по своим генотипическим свойствам он относится к виду *Clostridium butyricum*.

Развитие современной энергетики предполагает активное внедрение различных, альтернативных ископаемым, экологически чистых источников энергии, одним из которых является водород. Получать водород можно химическими, физико-химическими, фотохимическими и микробиологическими методами. Микробиологический водород (биоводород) продуцируют анаэробные и факультативно-анаэробные бактерии при брожении (темновой процесс) в мезофильных и термофильных условиях, а также он образуется фотосинтезирующими бактериями (светозависимый процесс) [1, 2]. Основная часть проектов [3–5] по получению биоводорода, реализуемых в настоящее время, как в России, так и за рубежом, направлена на разработку систем, состоящих из биореактора для темнового образования водорода сообществами анаэробных бактерий и биореактора для светозависимого образования водорода фотосинтетиками. Важными условиями обеспечения рентабельности производственного процесса получения биоводорода, с одной стороны, является доступность и дешевизна сырья и его переработки, с другой стороны – возможность поддержания процесса достаточно длительного время на высоком уровне производительности. Как показали исследования последних лет, крахмалсодержащее сырье и отходы являются коммерчески привлекательным исходным субстратом для бактериального получения водорода [6–8], но с технологической точки зрения его использование анаэробными бактериями еще не достаточно изучено.

Цель работы – выбор способа проведения анаэробной ферментации крахмала для получе-

ния водорода сообществом анаэробных бактерий и таксономическое определение бактерий, играющих ключевую роль в исследуемом сообществе микроорганизмов.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Исследовали анаэробное сообщество микроорганизмов ризосферы травяных растений, сформированное при культивировании на крахмалсодержащей среде в мезофильных условиях и представляющее смешанную культуру спорообразующих бактерий. Перед использованием в экспериментах микробное сообщество прошло длительную (более 10 пересевов) адаптацию к условиям культивирования.

Среды и условия культивирования. Ферментации анаэробного сообщества и выделение чистой культуры анаэробных бактерий проводили на среде КМ следующего состава (г/л): крахмал – 20, K_2HPO_4 – 5.0, KH_2PO_4 – 5.0, NaCl – 0.9, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.2, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.1, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0.15, $ZnCl_2$ – 0.01, L-серин – 1.0, L-цистеин · HCl – 0.5, раствор микроэлементов – 10 мл, раствор витаминов – 10 мл. Раствор микроэлементов содержал (мг/л): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5.0, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 1.0, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 1.7, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 1.0, $ZnCl_2$ – 0.1, $CuCl_2$ – 0.1, H_2BO_3 – 0.1, Na_2MoO_4 – 0.1, NaCl – 10.0, Na_2SeO_3 – 0.17, $NiCl_2$ – 5.0, Na_2WO_4 – 1.0, нитрилтриуксусная кислота – 128.0. Раствор витаминов содержал (мг/л): биотин – 0.02, тиамин · HCl (B_1) – 0.05, п-аминобензойная кислота – 0.05, пиридоксин · HCl – 0.1, рибофлавин – 0.05, никотиновая кислота – 0.05, пантотеновая кисло-

та – 0.05, липоевая кислота – 0.05, фолиевая кислота – 0.02, цианокобаламин – 0.001.

Культивирование. Выращивание смешанной культуры бактерий осуществляли в медицинских флаконах на 500 мл и объемом среды 200 мл. Флаконы герметично закрывали специальными резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками. Кислород из газовой фазы удалялся вакуумированием в течение 3 мин. Стерилизацию сред проводили автоклавированием в режиме 0.5 атм в течение 30 мин. Ферментацию осуществляли без перемешивания при 37°C. Посевной материал пастеризовали прогреванием культуры при 80°C в течение 10 мин и добавляли к среде в количестве 1–10%.

Для выделения чистой культуры водородобразующей бактерии использовали анаэробную технику Хангейта [9]. Получение чистой культуры вели повторными рассевами на среду КМ с добавлением 20 г/л агара (“Difco”, США) на чашках Петри, помещенных в анаэростат (“Oxoid”, Великобритания), с прогреванием и повторным выделением колоний.

Параметры роста. Рост определяли по оптической плотности культуральной жидкости на спектрофотометре “Spekol 201” (“ANALYTIK JENA AG”, ГДР), длина оптического пути составляла 1 см, длина волны 600 нм. pH среды и культуральной жидкости определяли на ионометре Анион 4101 (“Инфраспак-Аналит”, Россия), заданный диапазон pH 6.2–6.5 поддерживали добавлением 50%-ного раствора КОН.

Микроскопия. Морфологию культур изучали на препаратах типа раздавленная капля с глицериновой иммерсией в режиме фазового контраста при увеличении в 1000 раз. Препараты просматривались регулярно на оптическом микроскопе (“Carl Zeiss – AxioStar plus”, Германия).

Аналитические методы. Объем образующегося газа определяли по количеству вытесненной им воды [10]. Концентрацию водорода в выходящем газе измеряли на газовом хроматографе ЛХМ80 (“МПО Манометр”, Россия) с использованием катарометра и стеклянной колонки (1 м × 3 мм), заполненной молекулярными ситами, 30–40 меш. Температура колонки, инжектора и детектора составляла 40°C. В качестве газа-носителя использовали аргон, скорость потока 20 мл/мин. Пробу газа объемом 5 мл помещали в герметичный пенициллиновый флакон, заполненный водой, и хранили в перевернутом виде до определения.

Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Выделение ДНК из биомассы бактерий проводили по методике, описанной ранее [11]. Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК использовали универсальные праймеры 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1429R (5'-ACGG(Y)TACCTTGTACGACTT-3') и 515-

533F (5'-GTGCCAGC(M)GCCGCGGTAA-3'). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе Терцик (“ДНК-Технология”, Россия). Для получения ПЦР-фрагментов применяли следующий температурно-временной режим: начальная денатурация – 94°C, 3 мин; последующие 30 циклов – 94°C – 20 с, 55°C – 10 с, 72°C – 1 мин 30 с; конечная полимеризация – 72°C – 3 мин. Реакционная смесь (25 мкл) содержала: 1× буфер для Taq-полимеразы (“Fermentas”, Литва), 10–50 нг ДНК-матрицы, по 50 мкмоль каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (dNTP) (“Fermentas”, Литва), по 10 пмоль соответствующих праймеров (“Синтол”, Россия), 2.5 ммоль MgCl₂ и 1 ед. Taq-полимеразы (“Силекс”, Россия). Выделение и очистку фрагментов из агарозного геля выполняли с использованием набора реактивов (“Силекс”, Россия) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “Геном” Института молекулярной биологии РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru/>) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (“Applied Biosystems”, США) и с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 (“Applied Biosystems”, США) и прилагаемого к набору протокола.

Филогенетический анализ. Предварительный анализ полученной нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК проводили с помощью программного пакета BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Редактирование и выравнивание последовательностей проводили с помощью пакета программ ClustalX [12]. Филогенетическое древо было построено на основании нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК штамма ВФ и родственных видов рода *Clostridium* с помощью алгоритма “ближайших соседей” (“neighbour-joining”), реализованного в пакете программ MEGA 4 [13, 14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наши эксперименты состояли из двух пролонгированных ферментаций, из которых первая представляла собой сопряженное отъемно-доливное (ОД) культивирование, а вторая ферментация осуществлялась путем регулярного пересева (РП) анаэробного сообщества на новую среду.

Сопряженная отъемно-доливная ферментация. Осуществлялась для более глубокой переработки субстрата и накопления большого количества конечных продуктов обмена, особенно ацетата и жирных кислот, которые могут быть субстратами для фотосинтезирующих бактерий. Этот вид ферментации проводили параллельно в двух флаконах (флакон 1, флакон 2) (рис. 1). При этом из

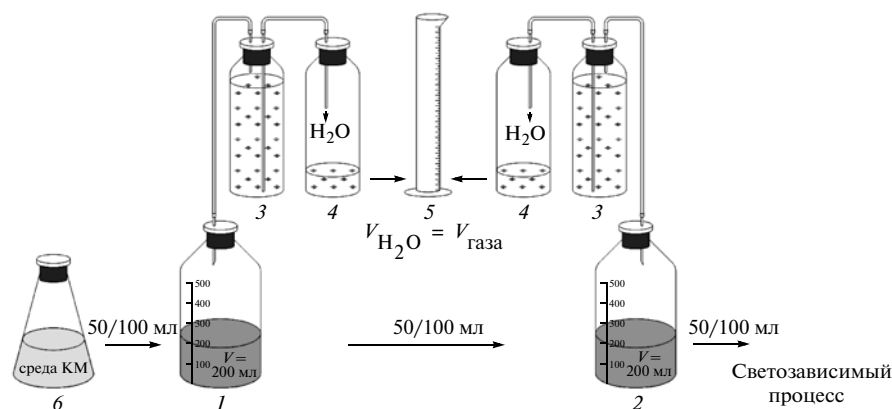


Рис. 1. Схема установки объемно-доливного культивирования анаэробного крахмалферментирующего микробного сообщества. 1 – флакон 1; 2 – флакон 2; 3 – сосуд для сбора газовой фракции; 4 – сосуд для сбора вытесненной воды; 5 – цилиндр для измерения объема вытесненной воды; 6 – емкость со свежей средой КМ.

флакона 2 удаляли от 50 до 100 мл культуры, вместо них добавляли такое же количество культуры из флакона 1, а во флакон 1 добавляли компенсирующее количество свежей питательной среды.

Ферментация во флаконе 1. Продолжительность ферментации анаэробного, продуцирующего водород сообщества бактерий во флаконе 1 составила 72 сут, и ее можно разделить на 3 этапа.

Первый этап продолжался 7 сут, и сообщество анаэробных бактерий росло как периодическая культура. В течение этой ферментации в среднем выделилось биогаза (смесь H_2 и CO_2) 1.48 л/л среды, при этом концентрация водорода в выходящем газе варьировала от 16 до 34%, а общий объем выделенного водорода составил около 22% от объема выделенного газа.

Второй этап ферментации анаэробного сообщества протекал в режиме ОД культуры в течение 21 сут. Ежедневно проводили отъем культуры из флакона 1 в количестве 50 мл, после чего добавляли в него новую питательную среду в том же объеме. Таким образом, объем анаэробной культуры во флаконе оставался постоянным (200 мл) в течение всего периода культивирования. За все время второго этапа из флакона 1 было изъято 1050 мл культуры, которая далее была использована в качестве посевного материала для флакона 2, и добавлено 1050 мл питательной среды, что соответствовало коэффициенту обновления культуры 5.2.

В течение второго этапа анаэробное сообщество флакона 1 продуцировало в среднем 99 мл газа в 1 сут. Концентрация водорода в выходящем газе варьировала от 13 до 29%, а среднесуточная концентрация водорода составила 19.5%. Таким образом, по образованию водорода относительные показатели на первом этапе культивирования сообщества были существенно лучше, чем на втором, где количество выделенного водорода со-

ставляло 0.10 л/л среды/сут, что в 2 раза меньше, чем на первом этапе.

Третий этап процесса проходил также в режиме ОД ферментации, но объемы отлива и долива были увеличены и составили 100 мл каждый. Этот этап ферментации продолжался 44 сут, и коэффициент обновления культуры был равен 22. За все время третьего этапа из флакона культивирования выделилось 36.94 л биогаза на 1 л среды со среднесуточным объемом 0.23 л/л среды. Максимальная концентрация водорода в газовой фазе составляла 39% (54 сут), а минимальная концентрация была 12% (69 сут). Общий объем выделенного на этом этапе водорода составил 27.1% от общего выхода газа третьего этапа.

Максимальная оптическая плотность сообщества (D_{600}) составляла 1.30 на первом этапе, 1.81 – на втором и 1.92 – на третьем. На каждом из этапов ферментации во флаконе 1 происходило закисление среды культивирования. Первый этап характеризовался максимальным снижением рН среды до 5.0, во время второго этапа средний уровень рН составил 6.0, а третий этап сопровождался изменением рН от 4.5 до 6.7.

Сравнивая процессы продукции газа и водорода на втором и третьем этапах ферментации крахмала анаэробным сообществом бактерий можно отметить, что увеличение объема долива и отлива культуральной среды позволило в 1.7 раза увеличить среднесуточное выделение газа и в 1.9 раза образование водорода при сопоставимой концентрации водорода: 19.5 и 22% соответственно.

Как показывают данные, представленные в табл. 1, за весь 72-суточный период ферментации из флакона 1 было выделено около 53.92 л биогаза на 1 л среды. Содержание водорода составило 25.2% от объема выходящего газа.

Ферментация во флаконе 2. Параллельно ферментации во флаконе 1 проводили культивирова-

Таблица 1. Основные показатели ОД ферментации анаэробного сообщества бактерий на крахмалсодержащей среде

№ флакона	Этапы ферментации	Время, сут	Выход биогаза, л/л среды	Диапазон содержания H_2 , %	Выход H_2 , л/л среды	Выход H_2 , л/л среды сут ⁻¹	D_{600} *
1.	Первый	7	6.59	16–34	1.48	0.21	1.30
	Второй	21	10.39	13–29	2.12	0.10	1.81
	Третий	43	36.94	12–39	10.03	0.23	1.92
	Всего	72	53.92	12–39	13.63	0.19	1.92
2.	Первый	7	5.27	24–47	412	0.29	1.13
	Второй	48	5.57	4–32	109	0.01	1.59
	Третий	17	3.55	0.6–6.0	20	0.06	1.72
	Всего	72	14.39	0.6–47	541	0.04	1.72

* Приведены значения максимальной оптической плотности в процессе ферментации.

ние анаэробного гидрогеногенного сообщества бактерий во флаконе 2 в режиме ОД культуры, но в качестве доливной жидкости использовали отливную культуру флакона 1.

Культивирование на первом этапе продолжалось 7 сут в режиме периодической культуры. При этом было выделено 5.27 л биогаза/л среды, содержащего 2.06 л H_2 /л среды, что составило 39% объема от всего выделенного на этом этапе газа.

Второй этап продолжался 48 сут и проходил в режиме ОД культуры. Объемы как доливной, так и отъемной культур составляли 50 мл. За время второго этапа ферментации имело место 12-кратное обновление объема культуры. На этом этапе ферментации из флакона 2 среднее суточное выделение газа составило 23 мл. Как количество газа в целом, так и образование водорода на втором этапе ферментации характеризовались своей неравномерностью. D_{600} культуры находилась в диапазоне от 0.92 до 1.63.

Третий этап ферментации анаэробного сообщества флакона 2 продолжался 17 сут с ежесуточной процедурой отъема культуры флакона 2 (100 мл) и долива культуры флакона 1 (100 мл). За 17 сут этого этапа ферментации коэффициент обновления составил 8.5. Общий объем выделенного биогаза на третьем этапе составил 3.55 л/л среды. ОД ферментация третьего этапа характеризовалась слабой продукцией водорода (0.6–6%); D_{600} в среднем составляла 1.60, то есть соответствовала плотности, свойственной стационарной фазе роста культуры. Третий этап характеризовался постоянным снижением pH, который достигал 6.0 (60 сут), а после нейтрализации щелочью максимально до значения в 6.45 (56 сут). За всю 72-суточную ферментацию сообщества, из флакона 2 было выделено 14.39 л биогаза на 1 л среды, в том числе 2.71 л H_2 /л среды.

Ферментация во флаконе 2 показала, что отливная культура флакона 1 продолжает поддержи-

вать процесс ферментации. Однако по многим физиологическим показателям сообщество флакона 2 существенно уступало сообществу флакона 1. Так, во флаконе 2 газа было выделено в 3.75 раза меньше, чем в первом, а водорода в 5 раз меньше.

Микроскопирование препаратов ОД культуры, как во флаконе 1, так и во флаконе 2 выявило наличие палочковидных бактерий кластридиального типа. Наблюдались подвижные и неподвижные клетки, а также спорангии с терминально расположенными спорами, отдельные споры, зернистые и деформированные клетки.

Ферментация методом регулярных пересевов (РП). Результаты ОД культивирования анаэробного микробного сообщества показали, что даже половинное ежесуточное разбавление культуры свежей средой (третий этап флакона 1) не приводило к продукции достаточного количества водорода. В связи с этим нами был проведен эксперимент, в котором регулярно через 4–6 сут производили пересев сообщества в следующий 500 мл медицинский флакон, содержащий 200 мл питательной среды. Ферментация в данном режиме продолжалась 103 сут, и было произведено 22 цикла пересевов консорциума, в среднем через каждые 4.7 сут. Суммарный объем выделенного газа составил 31.5 л (157.27 л/л среды), и в среднем на один пересев приходилось 1.37 л газа. Колебания в объемах выделенного биогаза за каждый цикл пересева составляли от 1.46 до 8.30 л/л среды. Водород выделялся на всех этапах ферментации в разных количествах. Максимальная суточная концентрация водорода в выходящем газе достигала 64% (79 сут ферментации): в 4 случаях она превышала 60%, в 16 случаях была больше 50%. Предварительные опыты по обогащению выходящего газа водородом путем пропускания его через раствор щелочи (50%-ный раствор КОН) показали, что коэффициент обогащения был равен приблизительно 2. При концентрации водорода в вы-

Таблица 2. Основные показатели ферментации анаэробного сообщества бактерий на крахмалсодержащей среде методом последовательных пересевов

Номер пересева	Время, сут	Выход биогаза, л/л среды	Диапазон содержания Н ₂ , %	Выход Н ₂ , л/л среды	Выход Н ₂ , л/л среды/сут	D ₆₀₀ *
0	6	5.52	19–51	2.61	0.44	1.67
1	2	1.46	27–38	0.50	0.25	1.72
2	6	4.11	10–42	1.54	0.27	1.76
3	6	7.10	44–57	3.85	0.64	1.74
4	4	6.65	43–57	3.65	0.91	1.78
5	4	6.64	43–57	3.68	0.92	1.73
6	6	8.06	43–53	4.14	0.69	1.80
7	4	8.19	49–57	4.39	1.10	1.69
8	4	6.17	52–59	3.45	0.86	1.74
9	4	5.53	53–62	2.95	0.74	1.71
10	4	6.17	52–61	3.28	0.82	1.76
11	5	8.34	44–57	4.52	0.91	1.83
12	4	7.29	47–55	3.83	0.96	1.64
13	4	6.42	47–52	3.20	0.80	1.79
14	6	8.61	49–56	4.35	0.72	1.75
15	4	7.00	50–57	3.86	0.97	1.66
16	4	7.86	53–62	4.67	1.16	1.58
17	4	7.28	53–64	4.49	1.12	1.75
18	4	7.65	46–59	4.12	1.03	1.62
19	5	7.05	48–58	3.97	0.79	1.73
20	4	8.30	48–56	4.40	1.10	1.73
21	4	8.16	30–55	4.19	1.05	1.71
22	5	7.76	45–56	4.17	0.83	1.74
Всего	103	157.27	10–64	83.78	0.81	1.83

* Приведены значения максимальной оптической плотности в процессе ферментации.

ходящем газе более 50% можно было получить обогащенный газ, содержащий до 100% водорода.

Оптическая плотность. В течение ферментаций в режиме РП наблюдалось закономерное изменение оптической плотности культуры в каждом промежутке времени между пересевами с максимумом к середине цикла. В начале каждого пересева D_{600} была, как правило, меньше 1, но уже на 1 сут культивирования сообщества оптическая плотность обычно превышала 1, и наибольшее ее значение составило 1.83.

pH среды культивирования. На протяжении всей ферментации имело место закисление среды культивирования, но оно носило циклический характер, соответствующий пересевам. Наибольшее закисление наблюдали обычно в 1 сут после пересева, но оно постепенно уменьшалось к 4 сут. Соответственно, уменьшался и расход щелочи для нейтрализации среды.

Морфология клеток анаэробного консорциума. Микроскопическая картина препаратов крахмалферментирующего сообщества при РП была весьма пестрой и во многом определялась фазой его роста. Обычно в начале каждого цикла пересева культуры наблюдались активные, в основном подвижные прямые палочки и пары клеток, тогда как в конце цикла клетки были неподвижными, наблюдались деформированные, зернистые формы, спорангии и отдельные споры. В целом, спорообразующие клетки составляли до 80% популяции клеток.

Характеристика культуры водородобразующих бактерий. Для получения чистой культуры крахмалферментирующих бактерий, исследуемое сообщество микроорганизмов после пастеризации было посеяно в десятикратных разведениях в жидкую и на твердую среду КМ. В результате последовательных пересевов был выделен штамм ВР строго анаэробных палочек, образующих эндоспоры, окрашивающихся по Граму положи-

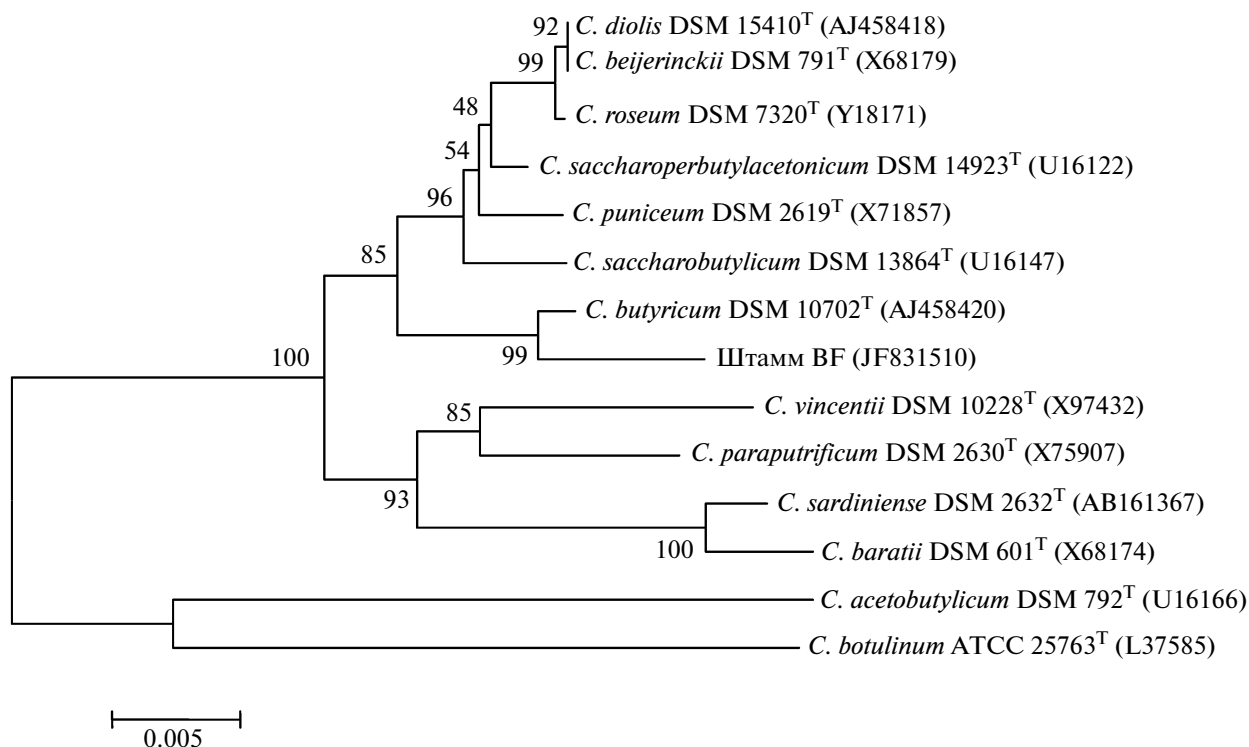


Рис. 2. Бескорневое филогенетическое древо представителей рода *Clostridium*, показывающее положение штамма BF. Цифрами показаны значения “bootstrap”-анализа. Для филогенетического анализа использованы типовые штаммы рода *Clostridium*. В скобках показаны номера последовательностей в GenBank.

тельно, и образующих H_2 на различных субстратах. Для этого штамма нами определена нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК, которая составила 1438 нуклеотидов, последовательность была депонирована в GenBank под номером JF831510. Поиск в GenBank с помощью программы BLASTn показал близкое родство штамма BF к представителям кластера I рода *Clostridium*. Штамм BF имел достаточно высокий уровень сходства по 16S рРНК (99.1–99.7%) с некоторыми штаммами, отнесенными к виду *Clostridium butyricum*, выделенными из анаэробных осадков сточных вод, из содержимого желудка кенгуру, компоста коровьего навоза и озерных отложений [15, 16].

На филогенетическом древе (рис. 2) показано положение штамма BF в составе рода *Clostridium*. Штамм BF объединяется в единый кластер с типовым штаммом вида *C. butyricum* с уровнем сходства нуклеотидных последовательностей 99.3%. Род *Clostridium* объединяет грамположительные спорообразующие строго анаэробные бактерии, не способные к сульфатредукции, и является к настоящему времени одним из самых больших по количеству видов. Он включает порядка 180 видов, отличающихся разнообразием морфологии и метаболических особенностей [17]. На основании сравнения последовательностей генов 16S

рРНК штамм BF следует отнести к виду *C. butyricum*, который хорошо известен как вид, образующий H_2 и масляную кислоту [18]. Предварительные исследования показали, что новый штамм может образовывать от 0.25 до 0.50 л H_2 г⁻¹ субстрата на крахмале, муке, глицерине, лактозе и глюкозе в условиях периодического культивирования, что соответствует лучшим показателям

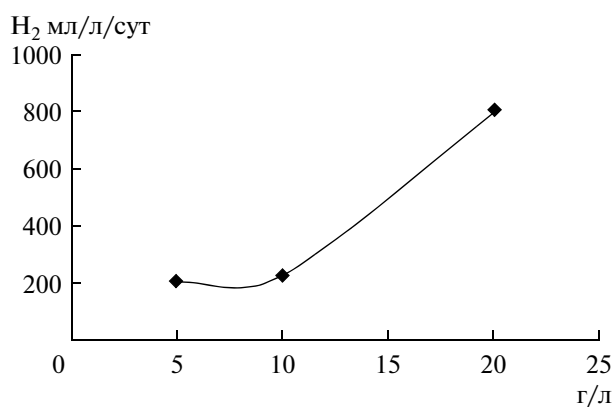


Рис. 3. Зависимость образования H_2 от содержания крахмала (г/л) в различных режимах культивирования: 5 и 10 – ОД ферментация; 20 – метод РП.

среди изученных штаммов мезофильных H_2 -образующих бактерий рода *Clostridium*.

Для решения технологических задач крахмалолитическое гидрогеногенное анаэробное сообщество бактерий должно удовлетворять определенным требованиям: в нем должны отсутствовать метаногены, водородпотребляющие, сульфатвосстанавливающие и ацетогенные бактерии. Для исключения из исследуемого сообщества посторонней микрофлоры и активации споровых бактерий, в том числе и клостридий, посевной материал подвергали пастеризации [19]. Особенностью питательной среды, использованной в экспериментах, являлось преобладание в ее составе хлоридных солей над сульфатными с целью ограничения развития сульфатвосстанавливающих бактерий. Другим важным фактором стало введение в нее соли цинка для того, чтобы предотвратить развитие метаногенов – основных потребителей водорода в анаэробных сообществах микроорганизмов [20]. В качестве основных источников азота были использованы аминокислоты, которые, как показали предыдущие исследования, оказались лучшими стимуляторами продукции водорода клостридиальными культурами [19]. Кроме того, состав среды культивирования анаэробного консорциума, в основном, определялся совместимостью темного процесса со светозависимым и обладал определенными селективными свойствами [4, 19].

Как показали проведенные исследования, культивирование анаэробного бактериального сообщества, как в режиме ОД культуры, так и в режиме РП обеспечивало пролонгирование продукции водорода примерно в 10–15 раз. Однако исследованные варианты ОД культуры не позволили получить достаточно высоких концентраций водорода в выходящем газе. Использование отъемной культуры анаэробного консорциума в качестве доливной жидкости приводило к дополнительной небольшой продукции водорода. Фактически, все изученные режимы культивирования различались по концентрации начального содержания крахмала на всех этапах ферментаций. Кривая на рис. 3 демонстрирует зависимость суточного выделения H_2 от содержания крахмала при различных режимах культивирования. Таким образом, полученные экспериментальные данные показывают, что использование метода регулярных пересевов позволяет поддерживать необходимое содержание крахмала в среде для наиболее эффективного образования водорода. Исследованное анаэробное сообщество содержало, в основном, споровые крахмалферментирующие бактерии по филогенетическим свойствам представляющие собой вид *C. butyricum*.

Авторы выражают искреннюю благодарность Т.В. Лауринавичене за помощь в измерении содержания водорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Цыганков А.А.* // Рос. хим. журн. 2006. Т. 50. № 6. 26–33.
2. *Levin D.B., Pitt L., Love M.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2004. V. 29. № 2. 173–185.
3. *Claassen P.A.M., De Vrije T.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2006. V. 31. № 11. P. 1416–1423.
4. *Laurinavichene T.V., Belokopytov B.F., Laurinavichius K.S., Tekucheva D.N., Seibert M., Tsygankov A.A.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2010. V. 35. № 16. P. 8536–8543.
5. *Нетрусов А.И., Карякин А.А., Тепляков В.В., Шальгин М.Г., Воронин О.Г., Абрамов С.М., Садрадинова Э.Р., Мутрофанова Т.И., Шестаков А.И.* // Катализ в промышленности. 2010. № 5. С. 77–83.
6. *Zhang T., Liu H., Fang H.H.P.* // J. Environ. Management. 2003. V. 69. № 2. P. 149–156.
7. *Yokoi H., Maki R., Hirose J., Hayashi S.* // Biomass Bioeng. 2002. V. 22. № 5. P. 389–395.
8. *Liu G., Shen J.* // J. Biosci. Bioeng. 2004. V. 98. № 4. P. 251–256.
9. *Hungate R.E.* // Methods in Microbiology / Eds. J.B. Norris, D.W. Ribbons. N.Y. Academic Press, 1969. P. 117–132.
10. *Kosourov S.N., Tsygankov A.A., Seibert M., Ghirardi M.L.* // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 78. № 7. P. 731–740.
11. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
12. *Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* // Nucleic Acids Research. 1994. V. 22. № 22. P. 4673–4680.
13. *Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.* // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. № 8. P. 1596–1599.
14. *Saitou N., Nei M.* // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. № 4. P. 406–425.
15. *Chong M-L., Rahim R.A., Shirai Y., Hassan M.A.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2005. V. 30. № 10. P. 1063–1070.
16. *Chen W.M., Tseng Z.J., Lee K.S., Chang J.S.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2009. V. 34. № 2. P. 764–771.
17. *Bergey's Manual of Systematic. V. 3: The Firmicutes / Eds. P.D. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman. N.Y.: Springer, 2009. 1450 p.*
18. *Cummins C.S., Johnson J.L.* // J. Gen. Microbiol. 1971. V. 67. № 1. P. 33–46.
19. *Belokopytov B.F., Laurinavichius K.S., Laurinavichene T.V., Ghirardi M.L., Seibert M., Tsygankov A.A.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2009. V. 34. № 8. P. 3324–3332.
20. *Заварзин Г.А.* // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1986. № 3. С. 341–360.

Prolonged Cultivation of an Anaerobic Bacterial Community Producing Hydrogen

B. F. Belokopytov, Ya. V. Ryzhmanova, K. S. Laurinavichyus, and V. A. Shcherbakova

*Scryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

e-mail: shcherb@ibpm, pushchino.ru

Received June 15, 2011

Abstract—This paper studies various methods of long-term maintenance of the process of hydrogen evolution during the growth of an aerobic bacterial community on a starch-containing environment. When cultured in separable trip fermentation mode for 72 days, from 0.10 to 0.23 H₂/l of medium/day was formed. The regime of regular reseeded lasted more than 100 days, forming an average of 0.81 l H₂/l of medium/day. The advantages and disadvantages of different methods of microbial hydrogen production during a dark starch fermentation process are presented. From the obtained H₂ forming microbial communities, we isolated an anaerobic spore-forming bacterium (strain BF). Phylogenetic analysis of the 16S PNA gene sequence of the new strain showed that according to its genotype it belongs to the *Clostridium butyricum* species.