

## ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ ТА БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ СОЛЬВЕНТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ РОДУ CLOSTRIDIUM

Скороцький С.О., Хоменко, Л.А., Войчук С.І., Підгорський В.С.

*Інститут мікробіології і вірусології НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна  
e-mail: bio-imv@ukr.net*

**Метою роботи** було виділення природних ізолятів сольвентогенних бактерій, скринінг та дослідження особливостей росту активних штамів продуцентів бутанолу, ацетону та органічних кислот на крохмальвмісних середовищах.

**Методи.** Роботу виконано з використанням класичних мікробіологічних, фізико-хімічних методів та за допомогою проточної цитофлуориметрії і газорідинної хроматографії. **Результати та висновки.** Виділені та досліджені анаеробні сольвентогенні бактерії (тобто такі, що утворюють розчинники бутанол, ацетон, етанол). Відібрані 5 штамів активних продуцентів розчинників, які ідентифіковано як вид *Clostridium acetobutylicum*. Досліджено здатність бактерій до синтезу ацетону, бутанолу і етанолу при рості на різних крохмальвмісних середовищах. Найбільшу кількість біобутанолу (10,4 та 9,0 г/л) синтезували штами SS-2 та SS-5, які проявляли стійкість до високих (цитотоксичних) концентрацій бутанолу.

**Ключові слова:** *Clostridium*, біобутанол, жирні кислоти, біодизель, сольвентогенні бактерії.

Протягом останнього десятиріччя значно зріс інтерес до виробництва хімічних речовин і палива з відновлювальних ресурсів. За своїми характеристиками біобутанол подібний до бензину та може використовуватись у транспортних засобах без зміни двигунів або їхніх технологій [1]. Світовий ринок бутанолу в даний час перевищує 4,5 млрд літрів і оцінюється більше, ніж у \$ 6 млрд [2].

В усьому світі збільшується кількість компаній, які працюють над розвитком нових технологій по підвищенню продуктивності виробництва біобутанолу. Основною проблемою його виробництва є інгібування росту мікроорганізму-продуцента, викликане збільшенням концентрації бутанолу в культуральній рідині. Крім того, види *Clostridium* строго анаеробні, тому анаеробні умови повинні бути створені до початку ферментації і залишаються незмінними до завершення процесу ферментації [3].

**Метою роботи** було виділення природних ізолятів сольвентогенних бактерій, скринінг та дослідження особливостей росту активних штамів продуцентів бутанолу, ацетону та органічних кислот на крохмальвмісних середовищах.

**Матеріали і методи.** Об'єктами дослідження були мікроорганізми, виділені з ґрунтів та мулів водойм м. Києва та Київської області.

Для виділення чистої культури бутилових бактерій використовували універсальне клостридіальне середовище такого складу (г/л): м'ясний екстракт – 10,0; дріжджовий екстракт сухий – 3,0; крохмаль розчинний – 1,0; глюкоза – 5,0; хлорид натрію – 5,0; гідрохлорид цистеїну – 0,5; оцтовокислий натрій безводний – 3,0; агар – 7,0 [4].

З метою підтримки бактеріальних клітин в активній фазі росту їх культивували на тіогліколевому бульйоні (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Індія) без струшування під шаром вазелінової олії при 37° С.

Для досліджень можливості засвоєння (збродження) цукрів використовували середовище Гісса з індикатором. Ідентифікацію до роду та виду проводили за визначником Берджі [5].

*Мікроскопіювання* проводили за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Primo Star (Німеччина). Для фотографування використовували камеру Canon PowerShot A640 (Японія). Визначення гранульози проводили фарбуванням препаратів з фіксованими клітинами розчином Люголю. Для дослідження морфології клітин використовували метод фарбування кристал-віолетом.

*Оптичну густину* суспензій бактерій вимірювали при довжині хвилі 590 нм нефелометричним методом за допомогою спектрофотометра Specord M-40 (Carl Zeiss, Jena, Німеччина) в кварцових кюветках з довжиною оптичного шляху 10 мм.

*Динаміку приросту біомаси* оцінювали за даними нефелометричних вимірювань оптичної густини клітинних суспензій.

*Питому швидкість росту* бактеріальних культур визначали методом нелінійної регресії [6].

*Визначення рН субстратів* проводили потенціометричним методом із застосуванням скляного електрода.

*Визначення флуоресценції бактерій при фарбуванні нільським червоним методом проточної цитофлуориметрії.* Флуорохромний барвник нільський червоний розчиняли в метанолі в концентрації 1 мг/мл і додавали до досліджуваних проб у співвідношенні 1:100 за 5 хв до проведення вимірювань методом проточної цитофлуориметрії.

*Вирощування бактерій з бутанолом.* Робоча концентрація бутанолу була 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 і 2,0%. Бутанол (SigmaAldrich Chemie GmbH, Німеччина) додавали безпосередньо перед внесенням бактеріальних клітин. Для досягнення анаеробних умов штами вирощували за допомогою інкубаційних контейнерів з газогенерацією Anaerocult-A (Merck KGaA, Німеччина) при 28°С впродовж 72 год. Стійкість бактерій до бутанолу оцінювалася за їх здатністю до збільшення біомаси.

Бактерії вирощували при різних концентраціях бутанолу в тіогліколевому середовищі при 28°С протягом 72 год. По 1 мл суспензій бактерій переносили в мікропробірки і центрифугували при 10 000 г/м 5 хв, ресуспендували в 950 мкл фосфатно-сольового буфера (ФСБ рН 7,2) і вносили 50 мкл глутарового альдегіду (25%). Через 15 хв при кімнатній температурі зразки двічі відмивали від глутарового альдегіду центрифугуванням, кожен раз витримуючи 15 хв в ФСБ. Після останньої промивки проби ресуспендували в 700 мкл ФСБ і вносили 300 мкл метанолу. Проби розміщували в холодильнику і зберігали при 4–10°С. За 5 хв до аналізу

методом проточної цитофлуориметрії до зразків додавали барвник нільський червоний і ретельно перемішували. За допомогою цитофлуориметру COULTER EPICS XL (Beckman, США) з програмним забезпеченням SYSTEM II визначали показники прямого світлорозсіювання (FS), бічного світлорозсіювання (SS) і величину логарифма флуоресценції на кожному із світлофільтрів ( $\log FL1 - \log FL4$ ). Флуоресценція на світлофільтрі FL2 відповідає вмісту нейтральних ліпідів в клітинах, а флуоресценція FL4 – вмісту полярних ліпідів [7]. Відповідно до отриманих даних визначали середнє значення, медіану і коефіцієнт варіювання. Дані представляли у вигляді точкових діаграм розсіювання, на яких кожна точка відповідає одному об'єкту (клітині), для якого були визначені усі досліджувані показники. При статистичній обробці даних вимірювали по 10000 об'єктів у кожному зразку.

*Для виявлення масляної кислоти* в культуральній рідині використовували якісну реакцію, яка полягає в тому, що нейтральні розчини маслянокислих солей під час нагрівання з  $FeCl_3$  набувають коричневого забарвлення з утворенням маслянокислого заліза (бурувато-коричневого забарвлення). У досліджувану пробірку наливали 5 мл культуральної рідини, в яку додавали 5%-й розчин хлориду заліза (2 мл) і нагрівали на полум'ї пальника. Як негативний контроль застосовували стерильне середовище з додаванням  $FeCl_3$ . Кількість маслянокислого заліза визначали за допомогою фотоелектроколориметра (540 нм). Як стандарт використовували вихідне поживне середовище. Концентрацію масляної кислоти в культуральній рідині визначали за допомогою калібрувального графіка.

*Наявність у середовищі культивування ацетону* визначали якісною реакцією, яка базується на взаємодії (конденсації) фенілгідразинів з кетонами з утворенням фенілгідразонів. При наявності ацетону у досліджуваних зразках випадає білий осад [8].

Кількісне визначення ацетону проводили на основі реакції утворення йодоформу з ацетону та йоду у лужному середовищі. Йод, що не вступив у реакцію, відтитровують 0,1 М розчином тіосульфату  $Na_2S_2O_3 \cdot xH_2O$ . Розчинений ацетон визначали у культуральній рідині. По різниці тіосульфату, що пішов на титрування контролю і досліді, визначали кількість йоду, що вступив у реакцію. 1 мл 0,1 н розчину  $Na_2S_2O_3 \cdot xH_2O$  відповідає 0,9675 мг йоду. Вміст ацетону в мг розраховували по формулі  $(A-B) \times x \times 0,9765 \times K$ , де А – наявність 0,1 М тіосульфату, що витрачено на титрування контролю, мл, Б – кількість 0,1 М тіосульфату, використаного для титрування досліді, мл. К – поправка на нормальність тіосульфату.

Вміст бутанолу, ацетону та етанолу в культуральній рідині визначали методом газорідинної хроматографії. Для дослідження використовували хроматограф Hewlett Packard 5890 з колонкою довжиною 1 м та внутрішнім діаметром 3 мм при нерухомій фазі-полісорб-1 та детекторі-катарометрі. Температура випаровувача та детектора – 250°C, колонки – 130°C. Газ-носії – гелій.

Результати досліджень обробляли статистичними методами. Різницю між середніми значеннями оцінювали відповідно до *t*-критерію, вважаючи достовірною при  $p \leq 0,05$ . Розрахунки проводили за допомогою пакета програмних засобів Microsoft Excel. Статистичну обробку даних, отри-

маних методом проточної цитофлуориметрії, здійснювали за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення Flowing Software версія 2.5.1 (Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Фінляндія).

**Результати.** Для отримання природних ізолятів сольвентогенних бактерій нами були відібрані проби з різних еконіш: річковий мул, чорнозем, польовий і лісовий ґрунти, торф, активний мул очисних споруд тощо (рис. 1). Попередній відбір штамів-продуцентів ацетону-бутанолу-етанолу (АБЕ) проводили візуально за виділенням вуглекислого газу, розрідженням щільного поживного середовища та загальним його освітленням, а також за наявністю спор.

Найбільша кількість штамів-продуцентів АБЕ була виділена з мулу річки Сувій (19%), курячого посліду та коров'ячого гною (по 13%), польового ґрунту (11%) та торфу (10%) (рис.1).

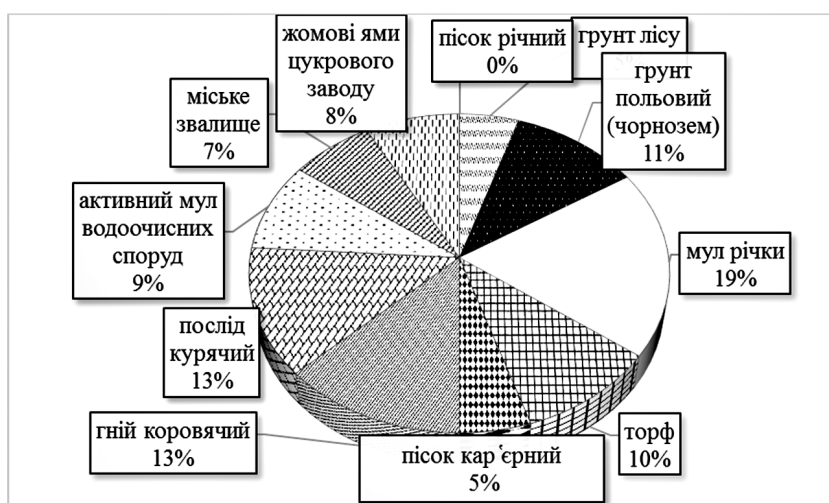


Рис 1. Місця виділення та кількість потенційних продуцентів ацетону- бутанолу-етанолу (АБЕ)

Відбір сольвентогенних бактерій проводили за наявності ацетону в середовищі культивування. Продуценти ацетону, в основному, були виділені з природних джерел, які містили у достатній кількості органічні речовини: активний мул річки Сувій, польовий ґрунт та курячий послід. Ізольовано 5 активних штамів, які продукували ацетон у кількостях 3,8–5,0 г/л. За культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними ознаками досліджені штами були віднесені до роду *Clostridium* і до виду *Clostridium acetobutylicum*.

Клітини бактерій – палочковидні, розміщені попарно чи в коротких ланцюжках. У процесі розвитку утворюють довгі ланцюжки, які через годину розпадаються на окремі клітини (рис. 2). Розмір молодих вегетативних клітин 0,6–0,7 x 3–5 мкм. Вони мають одну субтермінальну овальну спору, нерухомі, фарбуються за Грамом позитивно. На картопляному середовищі з глюкозою та агаром через 48 годин росту при 37°C в анаеробних умовах утворюють однорідні, сірувато-білі, непрозорі, з гладкою поверхнею, випуклі, круглі з рівними краями колонії діаметром 0,8–1,0 мм.

Виділені бактерії – гетеротрофні, облігатні анаероби, які не розріджують желатин, розривають м'ясо-пептоний агар внаслідок утворення газів, зброджують крохмаль, глюкозу, целобіозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, манозу, сахарозу, гліцерин та піруват. Вони засвоюють азот у формі солей амонію та суперфосфат. Додавання вуглекислого кальцію дозволяє підтримувати оптимальні значення рН у процесі росту. Необхідним фактором їхнього росту є біотин і пара-амінобензойна кислота, діапазон температур 15–45°C (оптимальна температура 37°C), рН 4,0–8,0 (оптимальне значення рН 5,5–6,0). В анаеробних умовах, при культивуванні на середовищі з 6 % ячмінним, житнім, кукурудзяним заторами та середовищі Рушмана утворюють *n*-бутиловий спирт, ацетон, етанол і виділяють вуглекислий газ та водень.

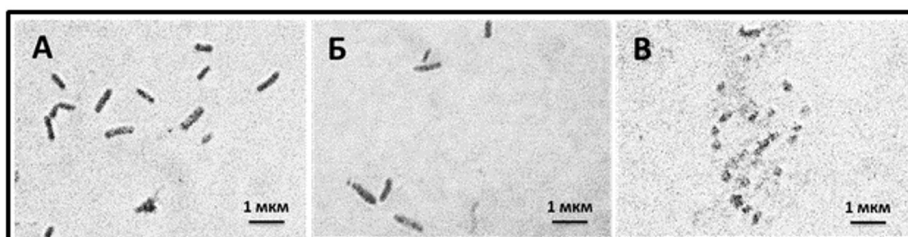


Рис.2. Морфологія клітин *Clostridium acetobutylicum* SS-5

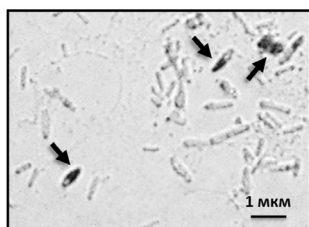


Рис.3. Утворення гранульози в клітинах сольвентогенної бактерії *Clostridium acetobutylicum* SS-5

Дослідження морфологічних змін клітин *Clostridium acetobutylicum* показали, що вегетативні клітини мають форму прямих паличок, які розміщені поодинокі або утворюють пари (рис. 2А). У кінці експоненційної фази росту клітини починають накопичувати гранульозу (з'являється сине забарвлення) (рис. 2Б та рис. 3) та формують позаклітинну капсулу, що веде до зміни їх форми з паличкової до сигаровидної, тобто форми кластрид.

У старіючій культурі клітини переходять до спороутворення (рис. 2В). Утворені спори мають овальну або сферичну форму.

Важливо було дослідити динаміку зміни рН у процесі ацетоно-бутилового бродіння. Нами проведено визначення придатності досліджених середовищ для росту мікроорганізмів, здатних до ацетоно-бутилового бродіння. На різних середовищах динаміка зміни значень рН у процесі бродіння майже не відрізнялась. Показано, що для розмноження ацетоно-бутилових бактерій початкове значення рН повинно бути близьким до нейтрального. При рН нижче 4,0–4,1 та вище 7,0–7,1 розвиток бактерій та утворення ними розчинників повністю призупиняються (рис. 4).



Протягом 12–14 годин бродіння спостерігається швидке наростання кислотності. Це пов'язано з тим, що у першій фазі бродіння утворюються більш окислені продукти – кислоти. У наступні 24–25 годин росту рН середовища різко підвищується. Це зумовлено тим, що бродіння вступає у другу фазу, яка характеризується утворенням нейтральних продуктів – розчинників. Швидкість бродіння є найвищою у другій фазі на 28 годину при рН 4,4 – 5,2. При закінченні бродіння спостерігається різке підвищення значення рН, яке можна пояснити утворенням значної кількості нейтральних продуктів – розчинників. Отже, зміна значення рН для штамів SS-1 і SS-2 відповідала вказаним фізіологічним межах.

Показники рН для штамів SS-4 та SS-5 мали відмінності в показниках зміни рН відносно інших штамів. Зниження рН відбувалось на 28–30 годину росту та не було різким. А для штаму SS-3 зниження рН відбувалось лише на 36 годину росту, а весь процес бродіння займав майже 160 годин. Варто зазначити, що найменшу кількість розчинників утворювали саме штами SS-3, SS-4 і SS-5. Очевидно, це пов'язано із відхиленням значень рН при бродінні від оптимальних значень рН, необхідних для забезпечення максимального виходу метаболітів.

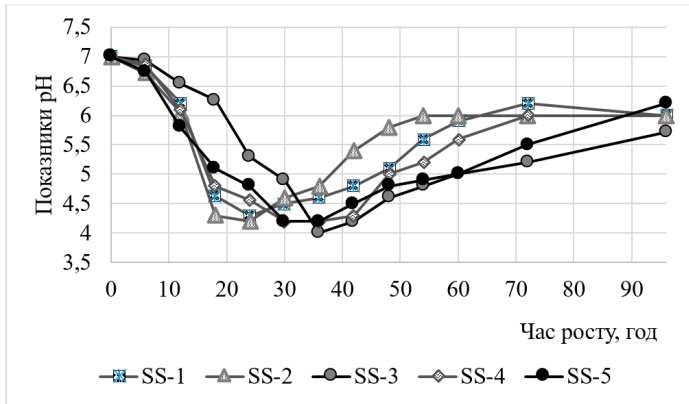


Рис. 4. Динаміка змін рН середовища бактерій *Clostridium acetobutylicum* (SS-1, SS-2, SS-3, SS-5) в процесі синтезу органічних розчинників

Нами була встановлена здатність штамів синтезувати ацетон, етанол, бутанол та масляну кислоту при рості на 6 % житньому заторі, який за результатами попередніх досліджень виявився найбільш оптимальним (рис. 5).

Показано, що найбільшу кількість розчинників (15,8–16,5 г/л) синтезували штами *Clostridium acetobutylicum* SS-2 та SS-5. Решта штамів менш активно продукували розчинники: показник 12,6–14,3 г/л. Така ж тенденція зберігалась по відношенню щодо синтезу *n*-бутанолу.

Кількість бутанолу становила 9,0 – 10,4 г/л для активних штамів-синтетиків (SS-2 та SS-5) і 7,1 – 8,3 г/л для решти штамів. Ацетон продукували всі штами у межах 4,0 – 5,3 г/л, а етанол – 0,7 – 1,3 г/л. Найшвидше суміш розчинників (за 54 години) синтезував штам *Clostridium acetobutylicum* SS-2. Найслабшим та повільнішим виявився штам SS-3.

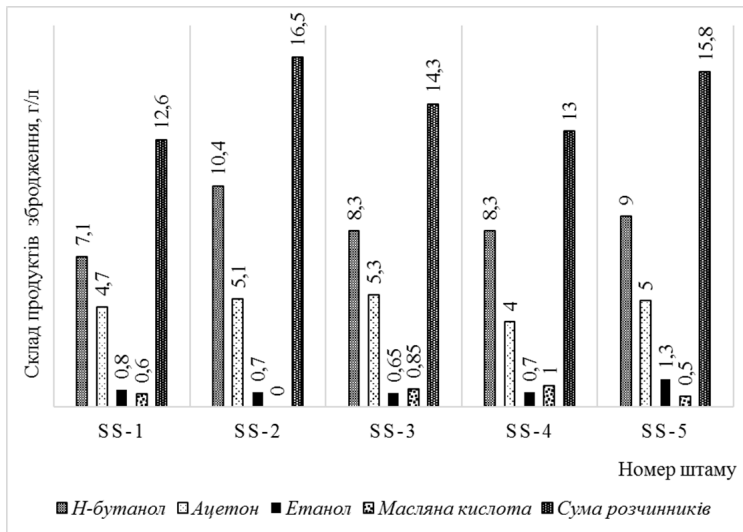


Рис. 5. Синтез розчинників штамами *Clostridium acetobutylicum*

Нами досліджена токсична дія різних концентрацій бутанолу на відібрані штами.

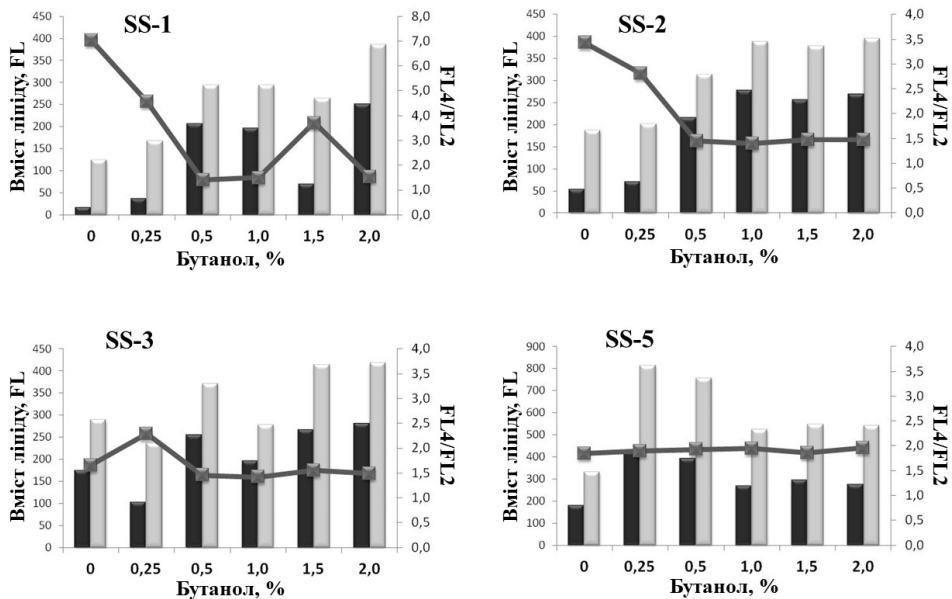


Рис.6. Вміст полярних (світлі стовпчики) і нейтральних (темні стовпчики) ліпідів. Співвідношення (точкова крива FL4/FL2) в клітинах сольвентогенних бактерій *Clostridium acetobutylicum* (SS-1, SS-2, SS-3, SS-5)

Клітини штамів не відрізняються за розмірами, адже середній показник прямого світлорозсіювання FS для всіх штамів однаковий. Так само і в присутності бутанолу не виявлено змін у розмірах клітин. Натомість в усіх штамів із збільшенням концентрації бутанолу спостерігалось збільшення вмісту нейтральних і полярних ліпідів (рис. 6). Найбільший по-

казник при концентрації бутанолу 0,25% і 0,5% виявлений для штаму SS-5. При більш високих концентраціях бутанолу вміст цих груп ліпідів знижувався в середньому до 500 од. флуоресценції на клітину. Штам SS-5 характеризувався найбільш стабільним співвідношенням FL4 до FL2, яке, незважаючи на кількісні зміни вмісту полярних і нейтральних ліпідів, залишалося на рівні 1,8–2,0, тоді як в інших штамів цей показник знижувався із збільшенням концентрації бутанолу в середовищі і в середньому при максимальній концентрації бутанолу досягав 1,5 одиниць.

Найбільш стійкий вміст нейтральних і полярних ліпідів спостерігали у штаму SS-1, в якого співвідношення FL4 до FL2 зменшувалося при наявності бутанолу (рис. 4).

Штам *Clostridium acetobutylicum* SS-2 характеризувався найбільшим вмістом нейтральних ліпідів при відсутності бутанолу, але їхня кількість зменшилася у 2,5 рази при його наявності. У штамі *Clostridium acetobutylicum* SS-4 виявлено низький вміст нейтральних ліпідів.

**Обговорення.** В останні роки все більше уваги в усьому світі приділяється альтернативним джерелам енергії, особливо біобутанолу, який отримують у результаті анаеробної ферментації сольвентогенних бактерій роду *Clostridium* на вуглеводмісній сировині [1, 2, 3].

Нами був проведений скринінг штамів-продуцентів АБЕ, які виділялись з різних екологічних ніш (рис.1) та містили велику кількість органічних речовин: мул річки Супій (19%), курячий послід, коров'ячий гній (по13%), польовий ґрунт (11%) та торф (10%). Відібрані штами за фізіолого-біохімічними ознаками були віднесені до виду *Clostridium acetobutylicum*, які є найбільш розповсюдженими продуцентами бутанолу. Одержані результати співпадають з даними досліджень багатьох авторів [3, 4, 9, 10].

При дослідженні морфології клітин штамів *Clostridium acetobutylicum* показано, що в процесі бродіння прямі палички (рис. 2А) на стадії утворення розчинників перетворюються на сигаровидну форму – тобто форму клостридій. Це відбувається в результаті накопичення гранульози (рис. 3), яка, за літературними даними, складається переважно з  $\alpha$ -1,4-зв'язаного поліглюкану [11]. Морфологічні зміни, в основному, асоційовані з перемиканням метаболізму від синтезу кислот до синтезу нейтральних продуктів – спиртів і ацетону [10]. У старіючій культурі клітини переходять до спорування. Відомо, що спори при потраплянні в сприятливе середовище проростають у вегетативні клітини, які у процесі росту і ділення перетворюють субстрати в кінцеві продукти [12]. Типове АБЕ бродіння ділиться на дві фази: експоненційний ріст («ацидогенез») та стаціонарна фаза («сольвентогенез»). В ацидогенезі клітини швидко ростуть і перетворюють вуглеводи до оцтової та масляної кислот, а рівень рН знижується (<5) [13]. Потім клітини клостридій переходять у другу фазу («сольвентогенез» або стаціонарну), в якій клітини починають повторно асимілювати кислоти (головним чином ацетат та бутират) з утворенням нейтральних розчинників, таких як: ацетон, бутанол та етанол. Накопичення розчинників (особливо бутанолу) до певної кількості, як правило, збільшує проникність мембрани клітин та зменшує їхню стійкість до несприятливих факторів росту [14]. У результаті цього клітини починають утворювати



ендоспори та використовувати гранульозу. Спори можуть переносити різні стресові стани (ультрафіолетове світло, засуху чи мороз), а при покращенні умов вони проростають і починають новий цикл розвитку бактерій [15].

Важливою характеристикою для АБЕ бродіння є зміни рН середовища. Нами встановлено, що утворення бутанолу відбувається в середовищі з низьким рН ( $\leq 4,5$ ).

Слід зазначити, що біохімічні шляхи метаболізму мікроорганізмів під впливом рН середовища можуть різко змінюватися. Замість очікуваних продуктів, які утворюють мікроорганізми при оптимальному значенні рН середовища, можуть утворюватися зовсім інші хімічні речовини або менша кількість продукту при значеннях рН, відмінних від оптимальних.

Для біосинтезу розчинників сольвентогенними бактеріями широко використовують середовища з (5% – 7%) житньою мукою [9, 10, 12]. За нашими дослідженнями найбільшу кількість розчинників досліджені штами синтезували також на 6 % житньому заторі (рис. 5). Відомо, що середній вихід розчинників на середовищах з мукою становить 12,0 – 14,5 г/л для штамів *Clostridium acetobutylicum*, а для мутантних – 16,9 – 18,9 г/л [10, 12]. Це корелює з нашими результатами. Так, для активних штамів SS-2 та SS-5 цей показник становив 15,8 – 16,5 г/л.

Відомо, що в результаті накопичення бутанолу в процесі ацетоно-бутилового зброджування відбувається інгібування бактерій роду *Clostridium* продуктами власного метаболізму, а саме бутанолом. Концентрація 15 г/л бутанолу є критичною для росту клостридій та призводить до їх загибелі, а концентрація в межах 9–10 г/л порушує життєдіяльність цих мікроорганізмів [16]. У толерантних до високих концентрацій бутанолу бактерій відбувається збільшення в ліпідному складі клітинних мембран кількості насичених жирних кислот та співвідношення насичених кислот до ненасичених (S|U коефіцієнт) в 2 рази. Збільшення кількості насичених жирних кислот забезпечує стабілізацію мембранних структур та їх проникність для бутанолу [9].

Нами досліджена токсична дія різних концентрацій бутанолу на відібрані штами. Співвідношення FL4 до FL1 дозволило виявити найбільші відмінності впливу різних концентрацій бутанолу на флуоресценцію бактерій. Найстабільнішим показником виявилось співвідношення медіан флуоресценції на світлофільтрах FL4 до FL2, який практично в усіх випадках мав найбільшу позитивну величину. Флуоресценція FL2 відповідає вмісту нейтральних ліпідів в клітинах, а флуоресценція FL4 – вмісту полярних ліпідів [7]. Нами встановлено, що вміст бутанолу 0,25–0,5% не змінював ліпідний склад в клітинах в порівнянні з клітинами, які вирощені без бутанолу. Натомість в усіх штамів із збільшенням концентрації бутанолу виявлено збільшення вмісту нейтральних і полярних ліпідів (рис. 6).

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що найбільш активними продуцентами органічних розчинників можна вважати штами *Clostridium acetobutylicum* SS-2 та SS-5, які проявляли стійкість до досить високих (цитотоксичних) концентрацій бутанолу. Ці штами були нами депоновані в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

## ОСОБЕННОСТИ РОСТА И БИОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЛЬВЕНТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *CLOSTRIDIUM*

Скряцкий С.А., Хоменко Л.А., Войчук С.И., Подгорский В.С.

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

### Резюме

**Целью работы** было выделение природных изолятов сольвентогенных бактерий, скрининг и исследование особенностей роста активных штаммов-продуцентов бутанола, ацетона и органических кислот на крахмалсодержащих средах. **Методы.** Работу выполнено с использованием классических микробиологических, физико-химических методов, а также с использованием проточной цитофлуориметрии и газожидкостной хроматографии. **Результаты и выводы.** Выделены и исследованы анаэробные сольвентогенные бактерии (то есть такие, которые образуют растворители бутанол, ацетон, этанол). Отобраны 5 штаммов активных продуцентов растворителей, которые идентифицированы как вид *Clostridium acetobutylicum*. Исследована способность бактерий синтезировать ацетон, бутанол и этанол при росте на разных крахмалсодержащих средах. Максимальное количество биобутанола (10,4 и 9,0 г/л) синтезировали штаммы SS-2 и SS-5, которые также были устойчивы к высоким (цитотоксическим) концентрациям бутанола.

**Ключевые слова:** *Clostridium*, биобутанол, жирные кислоты, биодизель, сольвентогенные бактерии.

## GROWTH PECULIARITIES AND BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF SOLVENTOGENIC BACTERIA OF THE GENUS *CLOSTRIDIUM*

Skrotskyi S.A., Khomenko L.A., Voychuk S.I., Podgorsky V.S.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny St, Kyiv, 03143, Ukraine

### Summary

**The aim** of the work was to isolate natural solventogenic bacteria, to perform their screening and to study the peculiarities of the growth of the strains that actively produce butanol, acetone and organic acids on the starch-containing media. **Methods:** the current study was carried out with classic microbiological, physical and chemical methods, and by using flowcytometry and gas chromatography. **Results and conclusions:** There were isolated and studied anaerobic solventogenic bacteria (those that were able to produce butanol, acetone and ethanol). There were selected 5 strains that intensively produced solvents. These strains were identified as *Clostridium acetobutylicum*. The ability of these bacteria to synthesize acetone, butanol and ethanol under growth on various starch-containing media was studied. Shown that the highest quantities of butanol (10,4 g/L and 9,0 g/L) were synthesized by the strains SS-2 and SS-5 respectively, that were, at the same time, resistant to high (cytotoxic) concentrations of butanol.

**Keywords:** *Clostridium*, biobutanol, fatty acids, biodiesel, solventogenic bacteria.

1. Visioli et al. Recent advances on biobutanol production. *Sustainable Chemical Processes*. 2014; 2:15.
2. Jones D.T., Woods D. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiology Reviews*. 1986; 50: 484-524.
3. Kumar M., Gayen.K. Developments in biobutanol production: New insights. *Applied Energy*. 2011; 88: 1999-2012.
4. Sibirniy A.I. [Biofuel ethanol from lignocellulose (plant biomass): achievements, problems, perspectives]. *Bulletin of the National Academy of Sciences*. 2006; 3:32-48. Ukraine.
5. The Shorter Bergey's Manual of Determinant Bacteriology / Ed. J. Hoult. – Moscow, Mir: 1980, p. 495.
6. Varfolomeev S., Gurevich K. *Biokinetics*. Moscow, FAIR PRESS: 1999, p. 715.
7. De la Jara A., Mendoza H., Martel A., Molina C., Nordstron L., de la Rosa V. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Crypthecodinium cohnii*. *J. Appl. Phycol.* 2003; 15: 433-438.
8. Kim A.M. *Organic chemistry*. Novosibirsk, sib.univ. publishing house: 2002, p.971.
9. Kirpicheva T.U., Litvinovich NE, Bolotnik EV, Titok MA, Kolomiets E.I. Selection of bacteria *Clostridium acetobutylicum*, resistant to butanol. In: IX International Scientific Conference. “Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects; 2015, Sep 7-11; Minsk. P.157-158.
10. Bolotnik E. V., Chereshev A. A., Titok M. A., Kolomiets E. I. (), “Selection of butanol-resistant mutants of *Clostridium acetobutylicum* S1”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2017; 1: 30–38.
11. Shaheen R., Shirley M., Jones D.T. Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000; 2: 115–124.
12. Berezina O.V, Zakharova N.V, Yarotsky S.V, Zverlov V.V. [Microbial producer of butanol]. *Biotechnology*. 2011; 4: 8-25. Ukraine.
13. Skrivanová E., Marounek M. Influence of pH on antimicrobial activity of organic acids against rabbit enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* 2007; 52(1): 70–72.
14. Bowles L.K., Ellefson W.L. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985; 50: 1165–1170.
15. Wang Z., Keshwani D.R., Redding A.P., Cheng J.J. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresour.Technol.* 2010; 101: 3583–3585.
16. Moreira A.R., Ulmer D.C., Linden J.C. Butanol toxicity in the butylic fermentation. *Biotechnol. bioeng. symp.* 1981; 11:567-579.

Отримано 20.10.2017