

УДК 66.098:546.11

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.52116

## АНАЛІЗ ПРОДУКТИВНОСТІ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ОТРИМАННЯ ВОДНЮ ЗА ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ З РІЗНИМИ ТИПАМИ МЕТАБОЛІЗМУ, ПЕРСПЕКТИВНІ НАПРЯМКИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

© Л. С. Зубченко, Є. В. Кузьмінський

*У статті проаналізовано основні біотехнологічні методи отримання водню, а саме: біофотоліз води з використанням водоростей або ціанобактерій, темнове бродіння, а також отримання водню у мікробних паливних елементах. Розглянуто біохімічні особливості виробництва водню мікроорганізмами з різними типами метаболізму. Визначено недоліки кожного з методів та перспективні напрямки подальших досліджень*

**Ключові слова:** біоводень, темнове бродіння, пурпурні бактерії, гідрогенази, мікробний паливний елемент, екзоелектрогени

*The basic biotechnological methods of hydrogen production, namely biological water splitting, using algae or cyanobacteria, dark fermentation and bioelectrochemical systems are analyzed in the article. Biochemical features of hydrogen production by microorganisms with different types of metabolism are reviewed. Disadvantages of each method and the prospects for future research are determined*

**Keywords:** biohydrogen, dark fermentation, purple bacteria, hydrogenases, microbial fuel cell, exoelectrogens

### 1. Вступ

Водень, з точки зору зменшення емісії парникових газів в атмосферу, є ідеальним паливом, оскільки єдиним продуктом його згорання є вода. Більшість методів виробництва водню, які зараз використовують є досить дорогими та енергозатратними.

Утворення водню в метаболічних процесах, що протікають в живих організмах – це загальновідомий та давно встановлений факт. До методів, які використовують особливості метаболічних процесів, для біотехнологічного отримання водню відносяться біофотоліз води з використанням водоростей або ціанобактерій, темнове бродіння, а також отримання водню у мікробних паливних елементах. Водень може бути отриманий з використанням відновлювальних джерел енергії включаючи тверді та рідкі відходи, а також різноманітні стічні води багаті органічними речовинами.

### 2. Постановка проблеми та літературний огляд

Дослідженням та розробкою ефективних методів виробництва водню за використання біомаси займаються багато провідних вчених України і світу. Серед них варто виділити Д. Р. Лавлі, Б. Е. Логан, С. Марков та ін. [1, 2]. В Україні активні дослідження проводяться з продукування біоводню шляхом анаеробної ферментації та фотоферментації (О. Б. Таширевіч, Н. Б. Голуб, О. К. Золотарьова та ін.) [3, 4].

Незважаючи на велику кількість досліджень, що проводяться, та значну кількість нових розробок у цій галузі, біотехнології, технології отримання водню потребують подальшого удосконалення. Для підвищення продуктивності біосистем, що виробляють водень та збільшення ефективності самого процесу варто враховувати, що не лише технологічна складова є важливою, а і власне – біологічна, тобто особливості протікання метаболічних процесів, в залежності від

видового складу продуцентів, що використовують, методи їх виділення [4] тощо.

Метою огляду є аналіз існуючих методів біотехнологічного отримання водню та визначення «вузких місць», що можливо стримують широкомасштабне впровадження біотехнологій отримання водню.

Аналіз теоретичного підґрунтя та біохімічних основ процесів, що лежать в основі утворення водню організмами різних видів, необхідний для визначення напрямків подальших досліджень та підвищення ефективності біотехнологічних процесів виробництва водню.

### 3. Огляд сучасних досліджень біотехнологічних методів виробництва водню та аналіз продуктивності виділення водню мікроорганізмами з різними типами метаболізму

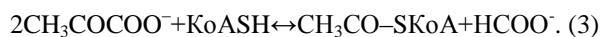
#### 3.1. Отримання водню шляхом анаеробної ферментації (темнового бродіння)

Генерування водню в процесі анаеробної ферментації здійснюється в основному строгими або факультативними анаеробними бактеріями в анаеробних умовах [5]. Основними субстратом для отримання водню слугують різноманітні органічні сполуки – такі як вуглеводи, цукри, білки і жири, комплексні органічні субстрати, наприклад, стічні води, багаті органічними речовинами: стічні води харчової промисловості, стічні води комунальних підприємств, відходи, які містять целюлозу та лігнінцелюлозу, стічні води тваринних ферм, цукровмісні стічні води, а також стічні води, які містять залишки олій та гліцеролу [6].

Основним етапом у всіх процесах метаболізму глюкози є перетворення глюкози до пірувату (1). При цьому теоретично може утворитися 2 молі водню при генеруванні НАДН. У більшості бактерій метаболізм глюкози до пірувату відбувається по шляху Ембдена-Мейєргофа-Парнаса:



Ключовим субстратом для отримання водню з органічних речовин є Ацетил-КоА, який утворюється з пірувату. Кількість Ацетил-КоА є фактором, який визначає кількість водню (2 молі чи 4 молі), що утвориться на моль спожитого цукру. В залежності від ферментної системи мікроорганізмів Ацетил-КоА може утворюватися у наступних реакціях:

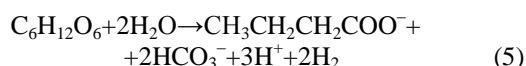


Реакцію (2) каталізує фермент піруват фередоксин оксидоредуктаза, коензим якого – фередоксин виступає в якості акцептора електронів. Ацетил-КоА, швидко метаболізується до ацетату чи бутирату, в обох випадках при реоксидизації з одного моля фередоксину утворюється 1 моль водню. Частина електронів у цьому шляху метаболізму переноситься на НАД<sup>+</sup>, при цьому генерується НАДН, який потім використовується для продукування водню за допомогою іншого метаболічного шляху [6].

Якщо кінцевим продуктом виступає ацетат то при гліколізі утворюється 1 додатковий моль водню при відновленні кожного моля НАДН. В такому разі загальний вихід водню становить 4 молі водню на моль спожитої глюкози і загальну реакцію можна записати як:

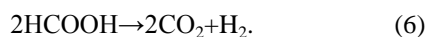


Коли кінцевим продуктом ферментації є бутират:



загальний вихід водню становить 2 молі на 1 моль глюкози, оскільки, утворені молекули НАДН витрачаються на окиснення Ацетил-КоА до бутирату. Такий шлях метаболізму притаманний мікроорганізмам родини *Clostridiaceae*, а саме *Clostridium pasteurianum* і *C. butyricum*.

Другий шлях, описаний рівнянням (3) призводить до одночасного утворення Ацетил-КоА і форміату, і каталізується ферментом піруват-форміат ліазою. Цей шлях метаболізму типовий для ентеробактерій таких як *Enterobacter aerogenes* і *Escherichia coli*, а також деяких представників родини *Clostridiaceae* [7]. Форміат, утворений в цій реакції може далі метаболізуватися з утворенням вуглекислого газу і водню:



Таким чином сумарний вихід водню для цього шляху становить 4 молі водню на моль спожитої глюкози.

При ферментації глюкози можливе утворення інших супутніх продуктів. Так, окрім ацетату, бутирату і форміату можуть утворюватися пропіонат, лактат, 2,3-бутандіол, етанол і ізопропанол. Утворення таких продуктів небажане при ферментації, оскільки це знижує вихід водню.

Проте, на практиці, вихід водню зазвичай значно нижчий ніж теоретично можливий. В більшості досліджень вихід водню не перевищує 1 моль на моль спожитого субстрату.

*Мікроорганізми, які використовують для анаеробної ферментації.* Ферментативне утворення водню здійснює широке коло мікроорганізмів. Ключову роль у регуляції метаболічних шляхів мікроорганізмів відіграють параметри зовнішнього середовища. Продукування водню можуть здійснювати змішані культури, отримані з природних середовищ, таких як ґрунт, активний мул, компост, чи чисті спеціально селекціоновані культури [7].

Серед воденьпродукуючих мікроорганізмів виділяють строгі анаероби: *Clostridium* а саме: *C. Butyricum*, *C. acetobutyricum* і *C. beijerinckii*, *C. Thermolacticum*, *C. tyrobutyricum*, *C. thermocellum* і *C. Paraputrificum* [8], *C. saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *C. thermocellum*, *Clostridium paraputrificum* [6], метилотрофи, метаногенні бактерії, археї, факультативні анаероби: *E. coli*, *Enterobacter (E. aerogenes* і *E. cloacae)*, *Citrobacter*, *Klebsiella* і навіть аероби (*Alcaligenes*, *Bacillus*).

Крім того, встановлено здатність продукувати водень у термофільних: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Thermoanaerobacterium* sp., зокрема *T. Thermo-saccharolyticum* [7, 9] і *Thermotoga* sp., зокрема *T. Maritima*, *T. elfii* і *Thermotoga neapolitana* [6] та гіпертермофільних *Caldoanaerobacter subterraneus* [7].

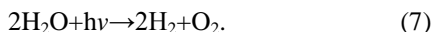
Отримання водню шляхом використання темної ферментації має певні проблеми, які гальмують широке впровадження цього методу. Основною проблемою є зменшення виходу водню через накопичення в культуральному середовищі продуктів метаболізму, зокрема оцтової кислоти та бутилової кислоти [10–12], метану, а також, іноді етанолу, лактату, форміату та пропіонової кислоти, які не можуть бути використаними мікроорганізмами, як поживний субстрат, тому вихід водню зменшується зі збільшенням кількості цих продуктів. Крім того, необхідна подальша утилізація цих побічних продуктів, для уникнення їх потрапляння у довкілля. Максимальний теоретичний вихід водню для анаеробної ферментації становить 4 молі на моль спожитої глюкози. На практиці вихід водню зазвичай нижчий від теоретичного, через те що певна кількість утвореного водню може споживатися мікроорганізмами в процесі метаногенезу, ще до того, як його вилучили з реактора. Тому, для отримання водню в таких системах необхідно вилучати метаногенів з мікробної популяції [6].

### 3. 2. Отримання водню за використання зелених водоростей і ціанобактерій

Фотосинтез є іще одним шляхом метаболізму, при якому може виділятися молекулярний водень.

Ці організми за способом живлення є фотогетеротрофами, джерелом енергії для цього процесу слугує сонячне випромінювання, а донором електронів – вода. Джерелом карбону для мікроорганізмів, які генерують водень фотосинтетичним шляхом є органічні кислоти, зокрема: оцтова, бутилова, малонова, водночас такі субстрати як глюкоза чи сахароза ними майже не споживаються [12].

В загальному вигляді процес утворення водню при фотосинтезі можна описати наступним рівнянням:

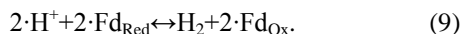


Утворення водню у зелених водоростей каталізується гідрогеназою згідно рівняння:

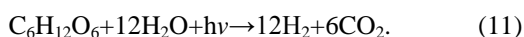


Однак, гідрогеназа є дуже чутливою до наявності кисню в середовищі. Окрім того, що цей фермент інактивується в аеробних умовах [13], при наявності кисню не відбувається експресія гену, що відповідає за її синтез. Тому, для отримання водню при використанні зелених водоростей необхідно створити безкисневі умови, а оскільки кисень також утворюється при фотосинтезі постає проблема його постійного видалення для підтримання цих умов.

Одним з таких методів є культивування водоростей за умов дефіциту сірки. В таких умовах водень відбувається реакція при якій відновлений ферредоксин відновлює водень замість НАДФ<sup>+</sup> [14]:



У ціанобактерій водень утворюється в процесі непрямого фотосинтезу в дві стадії:



При такому виді метаболізму кисень і водень утворюються на різних стадіях і тому можна уникнути інгібуючого впливу кисню на гідрогеназу.

На першому етапі відбувається фіксація CO<sub>2</sub>, в присутності ферменту RuBisCO, з наступним синтезом глюкози і кисню. На II етапі фотосинтезу, в присутності гідрогенази і нітрогенази, відбувається розкладання глюкози і утворення водню [15]. Нітрогенази ціанобактерій також чутливі до присутності кисню в середовищі і при наявності кисню інактивуються. Проте, експерименти [15] з *Anabaena variabilis* і *Anabaena azotica* показали значне збільшення загального виходу водню в тих системах, при додаванні водню під час культивування. Таке збільшення виходу водню пояснюють тим, що при наявності водню в культуральному середовищі, оборотна гідрогеназа каталізує реакцію, в якій беруть участь водень і кисень, вилучаючи при цьому кисень з середовища. При вилученні кисню, вихід водню збільшується за рахунок зменшення інгібуючого впливу на функціонування нітрогеази.

*Мікроорганізми, які мають здатність до фотосинтетичного утворення водню.* Серед фотосинтезуючих організмів, в якості продуцентів водню розглядають мікроскопічні зелені водорості і ціанобактерії [15].

Водорості, які здатні виділяти водень відносяться до різних систематичних груп. Зокрема, це ряд зелених водоростей (відділ *Chlorophycophyta*) із числа хроококових (порядок *Chlorococcales*), що відносяться до родів: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Kirchnella*, *Rhaphidium*, *Coelastdesmus*, *Codium*, *Selenastrum sp.*, а також *Chlamydomonas* і *Dunaliella*. Серед червоних водоростей здатність утворювати водень мають роди *Chondrus*, *Corallina*, *Geranium*, *Porphyridium* (відділ *Rhodophycophyta*), серед діатомових – відділ *Bacillariophycophyta-Diatomeae*, а саме: *Nitzshia ovalis* [14, 15].

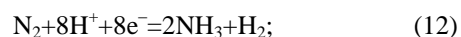
Основним фактором, який лімітує процес виділення водню фотосинтетичним шляхом – це мала швидкість росту мікроорганізмів, оскільки швидкість виділення водню напряму залежить від швидкості росту мікроорганізмів. Значний вплив на процес фотосинтетичного виділення водню чинить інтенсивність освітлення. Тому при використанні рідин, які мають високу мутність чи забарвленість кількість інтенсивність випромінювання, яке отримують клітини значно зменшується, що призводить до сповільнення фотосинтетичних процесів і зниження виходу водню [12].

### 3. 3. Отримання водню за використання пурпурних бактерій

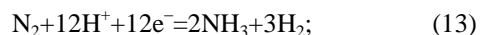
Водень у пурпурних бактерій утворюється у реакціях, які перебігають за участі гідрогеназ, як у зелених водоростей або нітрогеназ [2].

В залежності від виду нітрогенази, водень у пурпурних бактерій та ціанобактерій може утворюватися відповідно до трьох реакцій:

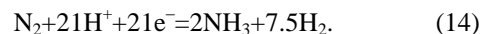
а) Мо-нітрогеназа:



б) V-нітрогеназа:



в) Fe-нітрогеназа:



Водень утворюється нітрогеназою в необоротній реакції, в якій 4 молекули АТФ витрачаються на продукування однієї молекули водню.

Генерування водню у пурпурних бактерій відбувається при наявності органічних кислот, наприклад, оцтової, малонної чи глюкози, а також інших органічних речовин.

Максимальний теоретичний вихід водню при споживанні цих речовин, відповідно до рівнянь (13)–(16) становить [15]:

– оцтова кислота:



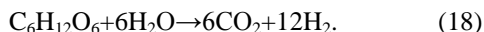
– молочна кислота:



– малоновая кислота:



– глюкоза:

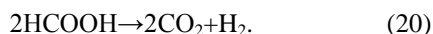


Також, ці бактерії мають здатність змінювати свій метаболізм на фотоавтотрофний і використовувати як джерело вуглецю CO<sub>2</sub>.

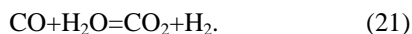
При створенні в клітині високого співвідношення НАДН/(НАД<sup>+</sup>+НАДН) гідрогеназа, яка каталізує розчеплення водню відповідно до реакції (19) може працювати в зворотному напрямку, що призводить до утворення водню [13]:



При відсутності світла у пурпурних бактерій водень може утворюватися у реакціях розкладання форміату до вуглекислого газу, які каталізує форміат-гідроген ліазний комплекс. Ця реакція супроводжується відновленням НАД<sup>+</sup>:



Для пурпурних нессульфурних бактерій також характерне утворення водню при проходженні шифт-реакції [13]:



В даній реакції водень утворюється з води. Ця реакція відбувається завдяки функціонуванню двох ферментів: гідрогенази і специфічної СО-гідрогенази [1] і не потребує присутності світла.

Серед пурпурних несірчаних бактерій, які мають здатність продукувати водень найбільш дослідженими є *Rubrivivax gelatinosus* [16] і *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides* [17].

Вихід водню в процесі фотоферментації за участі пурпурних бактерій залежить від багатьох факторів, серед них значно знижують вихід водню мала інтенсивність світла, надмірна або замала концентрація субстрату, присутність іонів амонію чи контамінація середовища [15]. Максимальний теоретичний вихід водню може досягати 12 моль на моль спожитої глюкози. Відсутність фотосистеми II у пурпурних нессульфурних бактерій дозволяє уникнути проблеми інгібування киснем процесу генерування водню.

### 3. 4. Отримання водню в фотокаталітичних системах

Окрім, генерування водню, в процесі фотосинтезу живими клітинами, досліджується також можливість отримання його при використанні окремих

органел клітин – хлоропластів і хромопластів або їхніх синтетичні аналоги [18].

Основним завданням залишається створення таких умов, при яких у ФС I переважає процес відновлення не НАДФ<sup>+</sup>, а води. Відомо, що кінцевим акцептором електронів в ФС II є залізо-сірчаний білок ферредоксин (Фд), відновлена форма якого в присутності спеціальних каталізаторів здатна виділяти водень при розкладанні води [18, 19].

Розроблені модельні біохімічні системи біофотолізу води, на основі виділених з рослинних клітин хромопластів [18, 20], які мають два спільних елементи: електрон-транспортний ланцюг (ЕТЛ) фотосинтезу і каталізатор для утворення водню, в якості якого можуть бути використані як біологічні (різноманітні гідрогенази), так і неорганічні (колоїдна платина, RuO<sub>2</sub>) каталізатори. В той же час, в якості відновника води може виступати як безпосередньо ферредоксин, так і спеціально введений в систему проміжний переносник електронів М, який може виступати акцептором електронів з ЕТЛ хлоропластів і відновлювати воду.

Недоліками таких систем є мала енергетична ефективність перетворення сонячної енергії в хімічну, яка для таких модельних систем не перевищує 0,2 %, в той час як теоретичне значення складає близько 17 %. Другою суттєвою проблемою є недостатня стабільність таких систем у часі (до 30 днів) [18].

### 3. 5. Отримання водню з використанням біоелектрохімічно-активних мікроорганізмів (мікроорганізмів-екзоелектрогенів)

Біоелектрохімічні системи, такі, як мікробні паливні елементи (МПЕ) – це системи, які використовують здатність мікроорганізмів-екзоелектрогенів переносити електрони, виділені під час дихання назовні клітини для отримання електричної енергії чи водню. Екзоелектрогенам властивий специфічний тип метаболізму – анаеробне дихання, відповідно до якого вони використовують зовнішньоклітинний акцептор електронів (природних умовах оксиди заліза або мангану). Через ланцюг переносу електронів електрони переходять до цитохромів зовнішньої мембрани клітини. Електрони, покидають ланцюг переносу електронів у формі водню, який може розкладатися до протонів і двох електронів. Від зовнішньої мембрани електрони переносяться на електрод (анод), з якого – у зовнішнє електричне коло.

Оскільки, загальна реакція перетворення субстрату у водень у біоелектрохімічній системі (22) є ендотермічною, то для отримання водню прикладають додаткову напругу (зазвичай в межах 0,4–0,7 В) [21].



Протони на катоді рекомбінують з електронами відповідно до реакції:



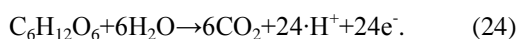
Через різницю потенціалів на катоді і аноді формується електричний струм і напруга. Для утворення водню на катоді необхідний електрохімічний

потенціал становить  $-0,41$  В. Відповідно до останніх досліджень [22] анодний потенціал МПЕ при розімкненому колі становить  $-0,300$  В. Тому, прикладання зовнішньої напруги до катода, більшої ніж  $0,11$  В, дозволяє подолати термодинамічний бар'єр.

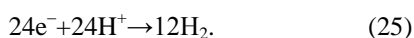
Субстратами, які мікроорганізми використовують для свого метаболізму можуть бути етанол, глюкоза, молочна кислота, форміат, амінокислоти, а також комплексні субстрати, наприклад стічні води, сироватка, тобто, практично будь-яка органічна речовина.

Так, при використанні глюкози в якості субстрату, реакція метаболізму має вигляд:

1. Анодна реакція:

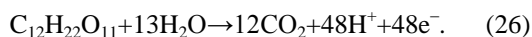


2. Катодна реакція:



При споживанні сахарози:

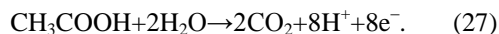
1. Анодна реакція:



2. Катодна реакція:  $48e^- + 48H^+ \rightarrow 24H_2$ .

Екзоелектронгени, крім того, здатні споживати оцтову кислоту рівняння (27), яка є кінцевим продуктом багатьох анаеробних метаболічних шляхів [22]:

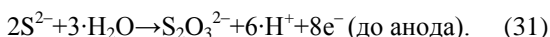
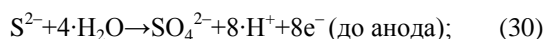
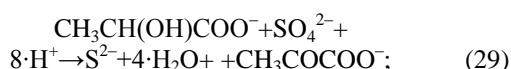
1. Анодна реакція:



2. Катодна реакція:



Сульфатредукуючі бактерії (*Desulfovibrio desulfuricans*), які використовують сульфат, як кінцевий акцептор електронів при диханні в якості субстрату можуть використовувати лактат [23]:



Мікроорганізми, що мають здатність до екзоелектрогенезу. Здатність до екзоелектрогенезу мають мікроорганізми різних еволюційних груп, які належать наступних родин: *Geobacteraceae*, *Desulfurotonaceae*, *Alteromonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Clostridiaceae*, *Aeromonadaceae*, і *Cotimonadaceae* [13, 24], *Gammaproteobacteriaceae*, *Betaproteobacteriaceae*? *Rhizobiaceae* і термофільні *Thermincola carboxydophila*, *Deferribacter ferribacter*, *Coprothermobacter sp.* [25].

Використання МПЕ, дозволяє отримати найбільший теоретичний вихід водню (12 моль на моль

спожитої глюкози), оскільки метаболізм екзоелектрогенів відбувається до найменш енергоємних кінцевих продуктів. Ще однією перевагою є здатність екзоелектрогенів споживати і перетворювати продукти, які для інших мікроорганізмів є кінцевими продуктами метаболізму. Серед недоліків біоелектрохімічних систем для отримання водню найзначимішим є висока вартість матеріалу катода.

#### 4. Результати дослідження

Враховуючи вищеописані метаболічні особливості мікроорганізмів, що використовують для отримання водню, та проблеми, з якими стикаються при створенні реальних технологій на їх основі варто зазначити наступне. Більшість мікроорганізмів – продуцентів водню, мають вибірково здатність споживати органічні речовини того чи іншого класу, що робить загальний вихід водню у біологічних процесах невисоким.

Шляхом підвищення ступеня конверсії речовин є розробка двостадійних методів, першим етапом яких є темнова ферментація, а другим фотосинтетичне отримання водню [7, 12], метаногенез або екзоелектрогенез. Використання такої системи дозволяє значно збільшити вихід водню за рахунок підвищення ефективності використання субстрату і зменшення кількості побічних продуктів темної ферментації, які використовуються на другій стадії [12]. Також важливим є підбір субстрату та розробка методів його попередньої обробки, для підвищення ефективності споживання субстрату [12, 13].

Одним з напрямків підвищення продуктивності біотехнологічних методів отримання водню є створення культур, які дають більший вихід водню, шляхом селекції мікробної асоціації [9, 12, 18] або, навіть, генетичної модифікації мікроорганізмів.

Втілення в життя ідеї отримання водню без використання цілих клітин, може дати можливість збільшити енергетичний вихід, оскільки енергія не витрачатиметься на ріст і життєдіяльність самих клітин, а також зменшиться залежність системи від зовнішніх факторів, що могли б вплинути на життєдіяльність мікроорганізмів.

#### 5. Висновки

Біотехнологічне отримання водню наразі має ряд складнощів, для вирішення яких необхідне поєднання знань в різних галузях науки та техніки: мікробіології, біохімії, електрохімії, інженерії тощо.

Здатність воденьпродукуючих мікроорганізмів споживати різноманітні органічні субстрати дає змогу використовувати в якості сировини для виробництва водню відходи, багаті органічними речовинами, наприклад стічні води підприємств харчової промисловості, що мінімізує витрати на сировину та сприяє вирішенню проблеми знешкодження відходів. Використання технологій, що поєднують в собі біологічні та електрохімічні процеси, дозволяє підвищити продуктивність процесу та реалізувати екологічно-безпечне та енергоефективне використання сировини.

**Література**

1. Lovley, D. R. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms [Text] / D. R. Lovley // *Nature Reviews Microbiology*. – 2006. – Vol. 4, Issue 7. – P. 497–508. doi: 10.1038/nrmicro1442

2. Markov, S. Bioreactors for H<sub>2</sub> production by purple nonsulfur bacteria [Text] / S. Markov, P.F. Weaver // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2007. – Vol. 145, Issue 1-3. – P. 79–86. doi: 10.1007/s12010-007-8032-z

3. Голуб, Н. Б. Анаеробне очищення стічних вод пивзаводів з одночасним одержанням водню [Текст] / Н. Б. Голуб, К. О. Щурська, М. В. Троценко // *Хімія і технологія води*. – 2014. – № 2. – С. 163–176.

4. Пригула, І. Р. Усовершенствование метода выделения водородобразующих бактерий рода Clostridium [Текст] / І. Р. Пригула, О. Б. Таширев // *Мікробіологічний журнал*. – 2012. – Т. 74, № 6. – С. 58–64.

5. Щурська, К. О. Способи продукування біоводню [Текст] / К. О. Щурська, С. В. Кузьмінський // *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. – 2011. – № 3. – С. 105–114.

6. Chong, M.-L. Biohydrogen production from biomass and industrial waste by dark fermentation [Text] / M.-L. Chong, V. Sabaratnam, Y. Shirai, M. A. Hassan // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2009. – Vol. 34, Issue 8. – P. 3277–3287. doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.02.010

7. Ntaikou, I. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation [Text] / I. Ntaikou, G. Antonopoulou, G. Lyuberatos // *Waste and Biomass Valorization*. – 2010. – Vol. 1, Issue 1. – P. 21–39. doi: 10.1007/s12649-009-9001-2

8. Venkata, M. S. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: process evaluation towards optimization [Text] / M. S. Venkata // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2009. – Vol. 34, Issue 17. – P. 7460–7474. doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.05.062

9. Saripan, A. F. Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1: Culture conditions optimization using mixed xylose/arabinose as substrate [Text] / A. F. Saripan, A. Reungsang // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2013. – Vol. 16, Issue 1. doi: 10.2225/vol16-issue1-fulltext-1

10. Chena, C.-Y. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes [Text] / C.-Y. Chen, M.-H. Yang, K.-L. Yeh, C.-H. Liu, J.-S. Chang // *Changa International Journal of Hydrogen Energy* – 2008. – Vol. 33, Issue 18. – P. 4755–4762. doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.06.055

11. De Amorim, E. L. C. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor [Text] / E. L. C. de Amorim, L. T. Sader, E. L. Silva // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 166, Issue 5. – P. 1248–1263. doi: 10.1007/s12010-011-9511-9

12. Hay, J. X. W. Biohydrogen production through photofermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen usage [Text] / J. X. W. Hay, T. Y. Wu, J. C. Juan, J. Md. Jahim // *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. – 2013. – Vol. 7, Issue 3. – P. 334–352. doi: 10.1002/bbb.1403

13. Seifert, K. Microbiological methods of hydrogen generation, biogas [Text] / K. Seifert, M. Thiel, E. Wicher, M. Włodarczak, M. Łaniecki. – Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University, Poznań, Poland, 2012. – P. 225–250. doi: 10.5772/33563

14. Oh, Y.-K. Biohydrogen production from carbon monoxide and water by *Rhodospseudomonas palustris* P4 [Text] / Y.-K. Oh, Y.-J. Kim, J.-Y. Park, T. H. Lee, M.-S. Kim, S. Park // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2005. – Vol. 10, Issue 3. – P. 270–274. doi: 10.1007/bf02932024

15. Bothe, H. Maximizing hydrogen production by cyanobacteria [Text] / H. Bothe, S. Winkelmann, G. Boison // *Zeitschrift für Naturforschung C*. – 2008. – Vol. 63, Issue 3-4. – P. 226–232. doi: 10.1515/znc-2008-3-412

16. *Натуральное электричество: фотосинтез – дело будущего [Электронный ресурс]*. – Популярная механика, 2006. – Режим доступа: <http://www.pomech.ru/article/670-naturalnoe-elektrichestvo/>

17. Chongcharoenthaweek, P. Metabolic flux balance analysis for biological hydrogen production by purple nonsulfur bacteria [Text]: Int. conf. on food eng. and biotech. / P. Chongcharoenthaweek, Z. Jiangdong, F. Mavituna. – IACSIT Press, Singapore, 2011. – Vol. 9.

18. Балашев, К. П. Фотокаталитическое преобразование солнечной энергии [Текст] / К. П. Балашев // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – № 8. – С. 58–64. – Режим доступа: [http://window.edu.ru/resource/259/21259/files/9808\\_058.pdf](http://window.edu.ru/resource/259/21259/files/9808_058.pdf)

19. Рубин, А. Б. Регуляция первичных процессов фотосинтеза [Текст] / А. Б. Рубин, Т. Е. Кренделева // *Успехи биологической химии*. – 2003. – Т. 43. – С. 225–265. – Режим доступа: <http://www.inbi.ras.ru/ubkh/43/rubin.pdf>

20. Никандров, В. В. Неорганические полупроводники в биологических и биохимических системах: биосинтез, свойства и фотохимическая активность [Текст] / В. В. Никандров // *Успехи биологической химии*. – 2000. – Т. 40. – С. 357–396. – Режим доступа: <http://www.inbi.ras.ru/ubkh/40/nikandrov.pdf>

21. Logan, B. E. Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation [Text] / B. E. Logan // *Water Science & Technology*. – 2005. – Vol. 52, Issue 1-2. – P. 31–37.

22. Ahn, Y. Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures [Text] / Y. Ahn, B. E. Logan // *Bioresource Technology*. – 2010. – Vol. 101, Issue 2. – P. 469–475. doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.039

23. Dalvi, A. D. Microbial fuel cell for production of bioelectricity from whey and biological waste treatment [Text] / A. D. Dalvi, N. Mohandas, O. A. Shinde, P. T. Kininge // *International journal of advanced biotechnology and research*. – 2011. – Vol. 2, Issue 2. – P. 263–268.

24. Mathura, A. K. Microbial fuel cells: A promising technology for waste water treatment and power generation [Text] / A. K. Mathura, D. Singh // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 3057–3063.

25. Zielke, E. A. Design of a single chamber microbial fuel cell [Text] / E. A. Zielke // *Microbial Fuel Cell technology*. – 2005. – 35 p. – Available at: [http://www.engr.psu.edu/ce/enve/logan/bioenergy/pdf/engr\\_499\\_final\\_zielke.pdf](http://www.engr.psu.edu/ce/enve/logan/bioenergy/pdf/engr_499_final_zielke.pdf)

**References**

1. Lovley, D. R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4 (7), 497–508. doi: 10.1038/nrmicro1442

2. Markov, S. A., Weaver, P. F. (2007). Bioreactors for H<sub>2</sub> Production by Purple Nonsulfur Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 145 (1-3), 79–86. doi: 10.1007/s12010-007-8032-z

3. Holub, N., Shchurska, K., Trotzenko, M. (2014). Anaerobne ochyshchennia stichnykh vod pyvzavodiv z odnochasnym oderzhanniam vodniu [Simultaneous anaerobic wastewater treatment and hydrogen production]. *Journal of Water Chemistry. and Technology*, 2, 163–176.

4. Prytula, I., Tashyrev, O. (2012). Usovershenstvovanie metoda vydeleniia vodorobrazuiushchikh bakteriy roda Clostridium [Improvement of the isolation method of hydrogen, which is formed by bacteria of genus Clostridium] *Microbiology Journal*, 74 (6), 58–64.

5. Shchurska, K., Kuzminskii, Ye. (2011). Sposoby produkuvannya biovodniu [Methods of hydrogen production]. Scientific news "KPI", 3, 105–114.
6. Chong, M.-L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., Hassan, M. A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, 34 (8), 3277–3287. doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.02.010
7. Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. Waste and Biomass Valorization, 1 (1), 21–39. doi: 10.1007/s12649-009-9001-2
8. Venkata, M. S. (2009). Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. International Journal of Hydrogen Energy, 34 (17), 7460–7474. doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.05.062
9. Reungsang, A., Saripan, A. F. (2013). Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1: Culture conditions optimization using mixed xylose/arabinose as substrate. Electronic Journal of Biotechnology, 16 (1). doi: 10.2225/vol16-issue1-fulltext-1
10. Chen, C.-Y., Yang, M.-H., Yeh, K.-L., Liu, C.-H., Chang, J.-S. (2008). Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. International Journal of Hydrogen Energy, 33 (18), 4755–4762. doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.06.055
11. De Amorim, E. L. C., Sader, L. T., Silva, E. L. (2012). Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. Applied Biochemistry and Biotechnology, 166 (5), 1248–1263. doi: 10.1007/s12010-011-9511-9
12. Hay, J. X. W., Wu, T. Y., Juan, J. C., Md. Jahim, J. (2013). Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 7 (3), 334–352. doi: 10.1002/bbb.1403
13. Seifert, K., Thiel, M., Wicher, E., Wodarczak, M., Laniecki, M. (2012). Microbiological Methods of Hydrogen Generation. Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University, Poznań, Poland. 225–250. doi: 10.5772/33563
14. Oh, Y.-K., Kim, Y.-J., Park, J.-Y., Lee, T. H., Kim, M.-S., Park, S. (2005). Biohydrogen production from carbon monoxide and water by *Rhodospseudomonas palustris* P4. Biotechnology and Bioengineering, 10 (3), 270–274. doi: 10.1007/bf02932024
15. Bothe, H., Winkelmann, S., Boison, G. (2008). Maximizing Hydrogen Production by Cyanobacteria. Zeitschrift Für Naturforschung C, 63 (3-4), 226–232. doi: 10.1515/znc-2008-3-412
16. Natural'noe jelektrichestvo: fotosintez – delo budushhego (2006). Populjarnaja mehanika. Available at: <http://www.popmech.ru/article/670-naturalnoe-elektrichestvo/>
17. Chongcharoenthaweesuk, P., Jiangdong, Z., Mavituna, F. (2011). Metabolic flux balance analysis for biological hydrogen production by purple non-sulfur bacteria. IACSIT Press, Singapore, 9.
18. Balashev, K. (1998). Fotocataliticheskoe preobrazovanie solnechnoy energii. [Photocatalytic conversion of sun energy]. International Soros Science Education, 8, 58–64. Available at: [http://window.edu.ru/resource/259/21259/files/9808\\_058.pdf](http://window.edu.ru/resource/259/21259/files/9808_058.pdf)
19. Rubin, A. (2003). Reguliatzia pervichnyh protsessov fotosinteza [Regulation of primary processes of photosynthesis]. Successes of biochemistry, 43, 225–265. Available at: <http://www.inbi.ras.ru/ubkh/43/rubin.pdf>
20. Nikandrov, V. (2000). Neorganicheskie poprovodniki v biologicheskikh i biochimicheskikh sistemah: biosintez, svoystva i fotohimicheskaja aktivnost [Inorganic semiconductors in biological and biochemical systems: biosynthesis, characteristics and photocemical activity]. Successes of biochemistry, 40, 357–596. Available at: <http://www.inbi.ras.ru/ubkh/40/nikandrov.pdf>
21. Logan, B. E. (2005). Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation. Water Science & Technology, 52 (1-2), 31–37.
22. Ahn, Y., Logan, B. E. (2010). Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures. Bioresource Technology, 101 (2), 469–475. doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.039
23. Dalvi, A. D., Mohandas, N., Shinde, O. A., Kinninge, P. T. (2011). Microbial fuel cell for production of bioelectricity from whey and biological waste treatment. International journal of advanced biotechnology and research, 2 (2), 263–268.
24. Mathura, A. K., Singh, D. (2007). Microbial fuel cells: A promising technology for waste water treatment and power generation. Environ. Sci. Technol., 35, 3057–3063.
25. Zielke, E. A. (2005). Design of a single chamber microbial fuel cell. Microbial Fuel Cell technology, 35. Available at: [http://www.engr.psu.edu/ce/enve/logan/bioenergy/pdf/engr\\_499\\_final\\_zielke.pdf](http://www.engr.psu.edu/ce/enve/logan/bioenergy/pdf/engr_499_final_zielke.pdf)

*Рекомендовано до публікації д-р біол. наук Гвоздяк П. І.  
Дата надходження рукопису 21.09.2015*

**Зубченко Людмила Сергіївна**, асистент, аспірант, кафедра екобіотехнології та біоенергетики, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», пр. Перемоги, 37, м. Київ, Україна, 03056  
E-mail: yellowjackets@ukr.net

**Кузьмінський Євген Васильович**, доктор хімічних наук, професор, завідувач кафедри, кафедра екобіотехнології та біоенергетики, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», пр. Перемоги, 37, м. Київ, Україна, 03056  
E-mail: kuzminskiy@ft.ntu-kpi.kiev.ua