

УДК 579.017.7

Микробный электросинтез

@ 2017 г. В.Г. ДЕБАБОВ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

e-mail: debabov@genetika.ru

Поступила 07.12.2016 г.

Электробиосинтез, осуществляемый микроорганизмами, представляет собой новую технологию с огромным потенциалом. В обзоре рассмотрены механизмы прямого транспорта электронов с катода в бактериальную клетку и ряд анаэробных процессов, катализируемых при таком транспорте: биосинтез водорода, метана и многоуглеродных соединений. Рассмотрены возможности использования электролизного водорода для роста водородокисляющих бактерий, а также немногочисленные примеры влияния электричества на восстановительные и окислительные процессы, происходящие при ферментации. Реализация потенциала электробиосинтеза потребует глубоких фундаментальных исследований механизмов внеклеточного транспорта электронов, сопряжения электрических и метаболических процессов. Потребуется работы по реорганизации геномов микроорганизмов с целью интенсификации их метаболизма и расширения репертуара синтезируемых метаболитов. Прогресс технологий будет зависеть не только от совершенствования микроорганизмов, но и от успеха работ по созданию эффективных биосовместимых электродов и дизайна высокопродуктивных реакторов.

Ключевые слова: микробный электросинтез водорода, метана, уксусной кислоты; ацетогены; внеклеточный транспорт электронов; электроферментация.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-9-28

В настоящее время мировая энергетика основана на сжигании ископаемого топлива – угля, газа и нефти, что сопровождается огромными выбросами двуокси углерода, являющейся парниковым газом. Уже сегодня наблюдается рост концентрации CO₂ в атмосфере и фиксируются изменения климата планеты¹.

Общей тенденцией в мировой экономике становится переход к технологиям, снижающим выбросы углекислого газа. Эта тенденция выражается в росте производства энергии на базе альтернативных источников, таких как ветер и солнце.

Согласно прогнозу Международного энергетического агентства (IEA), к середине столетия эти два источника будут давать *большую* часть всей электроэнергии².

Использование энергии солнца и ветра в электрических сетях осложняется неравномерностью работы таких установок (день и ночь; штиль и шторм). На сегодняшний день еще не разработаны компактные дешевые устройства для хранения больших количеств электроэнергии; решением проблемы может стать преобразование электрической энергии в энергию химических связей.

Список сокращений: БПК – биохимическая потребность в кислороде; BEAMR (BioElectrochemically Assisted Microbial Reactor) – микробный биоэлектрохимический реактор; BES (BioElectrochemical System) – биоэлектрохимическая система; EABs (Electrochemically Active Biofilms) – электрохимически активные биопленки; EET (Electron Extracellular Transfer) – внеклеточный электронный транспорт; MEC (Microbial Electrolysis Cell) – микробный электролизный элемент; MFC (Microbial Fuel Cell) – микробный топливный элемент; WLP (Wood–Ljungdahl Pathway) – путь Вуда–Льонгдала.

¹www.climate.nasa.gov/climateresource/24

²www.iea.org/newsroomandevets/pressrelease/2014/September

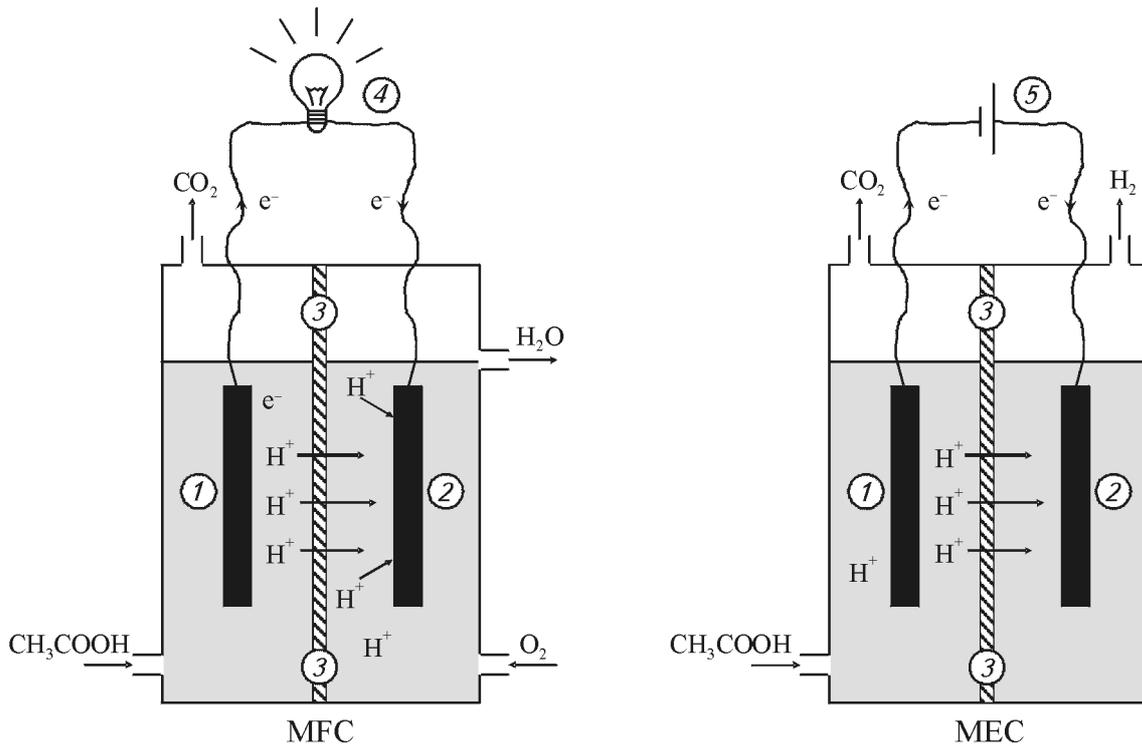


Рис. 1. Биоэлектрохимические системы (BES): 1 – анодная камера и анод; 2 – катодная камера и катод; 3 – ионоселективная мембрана; 4 – прибор, потребляющий ток; 5 – источник тока. Описание реакций на аноде и катоде см. в тексте

Fig. 1. Bioelectrochemical systems (BES): microbial fuel cell (MFC); microbial electrolysis cell (MEC); (1), anode chamber and anode; (2), cathode chamber and cathode; (3), ionselective membrane; (4), current-consuming device; (5), current source. For reactions on anode and cathode see the text

В простейшем случае это электролиз воды с образованием в качестве топлива водорода. К сожалению, этот процесс энергозатратен, а использование водорода в качестве энергоносителя встречает ряд известных трудностей (см. ниже).

Интересной альтернативой получения топлива и ценных химикатов является микробный электросинтез, при котором микроорганизмы акцептируют электроны с катода и используют их для восстановительных реакций. В широком смысле к электробиосинтезу относят получение водорода, метана, муравьиной кислоты, электроферментацию и фиксацию CO_2 с образованием многоуглеродных соединений. В более узком смысле под микробным электросинтезом подразумевают только фиксацию CO_2 .

Технологии электробиосинтеза имеют огромный потенциал, но находятся на ранних стадиях разработки. Данный обзор суммирует современные достижения в этой области и рассматривает ограничения, препятствующие практическому применению указанных технологий. Несколько обзоров, появившихся за последние пять лет, посвящены сходной тематике [1–5].

МИКРОБНЫЕ ТОПЛИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ (MFC) И МИКРОБНЫЕ ЭЛЕКТРОЛИЗНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ (MEC)

Процессы, в ходе которых клетки микроорганизмов катализируют окислительные и восстановительные реакции на электродах, относят к области биоэлектрохимии, а элементы MFC и MEC, в состав которых входят цепи, состоящие из клеток и электродов, обобщенно называются биоэлектрохимическими системами (BES).

Клетки микроорганизмов, используя органические вещества в качестве питания, производят углекислый газ, протоны и электроны. Образовавшиеся электроны могут служить источником электрического тока, который получают в специальных устройствах, называемых микробными топливными элементами (MFC) (рис.1). В этих устройствах в анаэробной анодной камере идет окисление органических соединений (вещества различной природы, в том числе бытовые или промышленные стоки). Образовавшаяся двуокись углерода удаляется из камеры, электроны поступают на анод и через него во внешнюю цепь (к клетке),

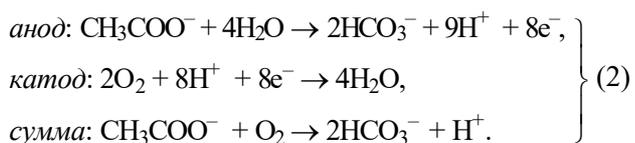
а протоны диффундируют к катоду через ионообменную мембрану. Катодная камера характеризуется аэробными условиями (в нее подается воздух); на катоде происходит встреча кислорода, протонов и электронов и образуется вода.

Для того, чтобы в МФС производилась энергия (электрический ток), разность свободных энергий Гиббса ΔG реакций на аноде и катоде должна быть отрицательной. Максимальное возможное напряжение (В) в МФС определяется по формуле:

$$V_{\text{макс}} = -\frac{\Delta G}{nF}, \quad (1)$$

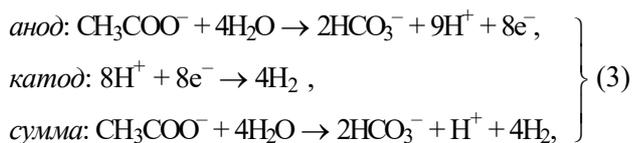
где ΔG – разность свободных энергий Гиббса, Дж/моль, на аноде и катоде; n – количество образовавшихся электронов, моль; F – константа Фарадея.

Свободная энергия Гиббса определяет максимальное количество полезной работы, которая может быть получена из данной реакции. Запишем реакции, протекающие на электродах, когда в анодной камере осуществляется окисление уксусной кислоты, а на катоде образуется вода (см. рис. 1):



В суммарной реакции $\Delta G = -847,6$ кДж/моль, и по уравнению (1) $V_{\text{макс}} = 1,10$ В [6]. Таково максимальное напряжение, возможное в данной системе. Напряжение в реальных МФС всегда меньше теоретического в силу омических потерь в системе, перенапряжения на электродах и т.д.

В отличие от МФС в микробных электролизных элементах (МЕС) (см. рис. 1) суммарные реакции на электродах осуществляются с положительной ΔG , т.е. для функционирования система требует подачи в нее энергии. Рассмотрим ту же схему окисления уксусной кислоты в анодной камере МЕС, но теперь катодная камера будет анаэробной, и на катоде будет выделяться водород:



Таким образом, если $\Delta G = 93,14$ кДж/моль, то $V_{\text{макс}} = -0,12$ В [6], т.е. для того, чтобы эти реакции осуществлялись в рассмотренной системе, необходимо подать дополнительное минималь-

ное напряжение в 0,12 В. В реальных системах в силу электрохимических потерь это напряжение должно быть существенно выше.

МФС интенсивно изучаются, начиная с 2000 г. В данном обзоре будут рассмотрены в основном исследования, посвященные МЕС, так как достижения в исследовании и практическом использовании МФС обобщены в ряде других обзоров [7–12]. МФС будут обсуждаться только в связи с механизмами внеклеточного электронного транспорта (ЕЕТ) и в сравнении с МЕС.

На катоде в МЕС могут абиогенно образовываться водород, муравьиная кислота (фумарат), аммиак. Однако те же вещества, а также метан и многоуглеродные соединения, такие как уксусная кислота и этанол, могут образовываться и биогенно, т.е. с помощью микроорганизмов, получающих электроны с катода.

Реакции на электродах относятся к окислительно-восстановительным, их принято характеризовать окислительно-восстановительным потенциалом. В таблице приведены стандартные окислительно-восстановительные потенциалы ре-

Стандартные электродные потенциалы реакций, происходящих на катоде в МЕС [1]

Standard electrode potentials of cathode-located reactions in MEC [1]

Реакция	Число электронов, участвующих в реакции	E^0 , В
$\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	4	+0,82
Фумарат \rightarrow сукцинат	2	+0,03
$\text{HCO}_3^- \rightarrow$ метан	8	-0,24
$\text{HCO}_3^- \rightarrow$ ацетат	8	-0,28
$\text{HCO}_3^- \rightarrow$ этанол	12	-0,31
$\text{HCO}_3^- \rightarrow$ полигидроксибутират	18	-0,31
$\text{HCO}_3^- \rightarrow$ формиат	2	-0,41
$\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2$	2	-0,41

Примечание: E^0 – стандартный электродный потенциал против стандартного водородного электрода при pH=7,0. E^0 , standard electrode potential against the standard hydrogen electrode at pH=7.0.

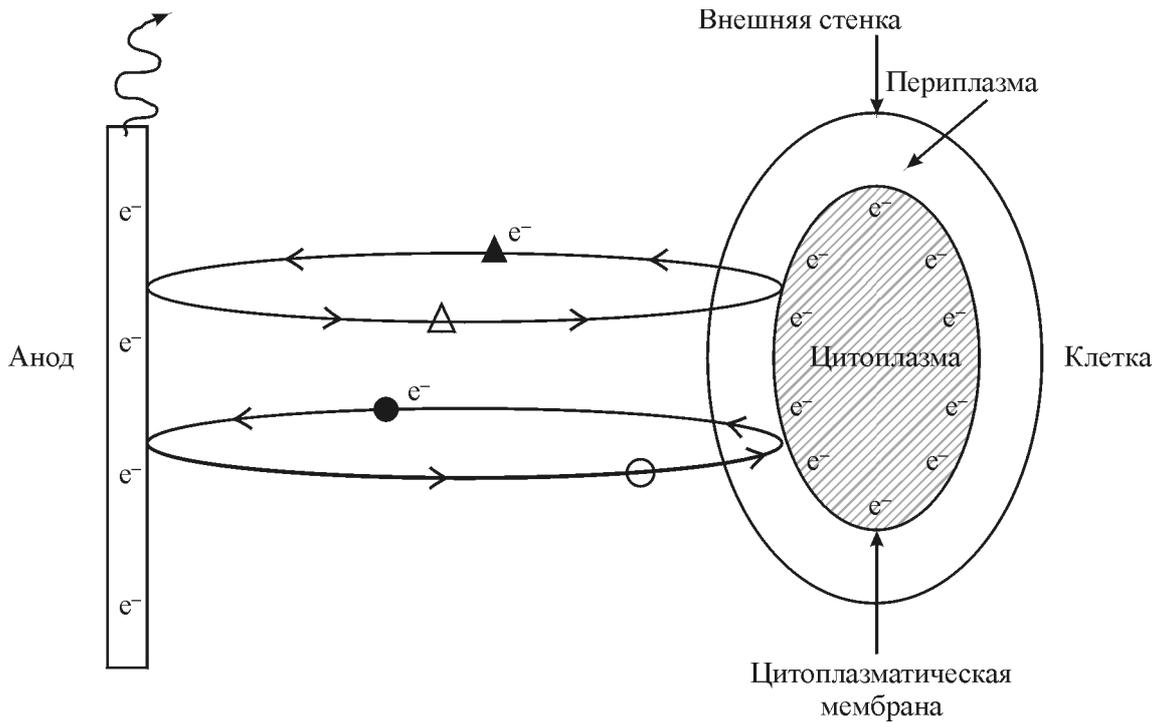


Рис. 2. Внеклеточный транспорт электронов от цитоплазматической мембраны на анод с помощью различных низкомолекулярных молекул-переносчиков (шаттлов): Δ – экзогенные переносчики, добавленные в среду; \circ – эндогенные переносчики, синтезируемые клеткой; \circ, Δ – окисленная форма переносчиков; \bullet, \blacktriangle – восстановленная форма переносчиков

Fig. 2. Electron extracellular transfer from cytoplasmic membrane to anode using various low-molecular shuttles: Δ , exogenous carriers added to the medium; \circ , endogenous carriers synthesized in a cell; \circ, Δ , oxidized carriers; \bullet, \blacktriangle , reduced carriers

акций, осуществляемых в МЭС на катоде [1]. На величину потенциала оказывает влияние концентрация реагентов, pH среды и температура; следовательно, в реальных МЭС эти величины отличаются от стандартных и не всегда могут быть точно определены.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ

Для всех электробиохимических процессов критическим является механизм переноса электронов от клетки на анод и с катода к клетке, т.е. внеклеточный транспорт электронов. В ходе окисления органических соединений восстановительные эквиваленты в виде восстановленных убихинонов накапливаются в цитоплазматической мембране бактериальной клетки. Их окисление приводит к высвобождению электронов, которые, двигаясь по дыхательной цепи, встречаются с конечным акцептором электронов – кислородом. Но дыхательная цепь локализована в цитоплазматической мембране, и кислород достигает ее путем диффузии через клеточную стенку и периплазму, т.е. сама дыхательная цепь не имеет контакта с

внешней средой. В анаэробных условиях электроны могут переноситься от цитоплазматической мембраны на электрод с помощью низкомолекулярных соединений, способных к обратимым реакциям окисления и восстановления. Такие соединения забирают электроны в периплазме бактериальных клеток и переносят их на электрод; они известны уже длительное время, и в космический век их стали называть «шаттлами» (челноками). В качестве шаттлов часто используют красители, такие как нейтральный красный [13] и метилвиолет [14] (рис. 2).

Некоторые бактерии могут синтезировать молекулы-шаттлы в процессе своего метаболизма. Так, бактерии р. *Pseudomonas* синтезируют феназины [15], а бактерии р. *Shewanella* – флавины (рибофлавин и флавиномононуклеотид) [16, 17]. Инактивация генов флавиногенеза на 75% снижает способность бактерий *Shewanella* производить электрический ток в MFC [16].

Преимуществом использования природных или синтетических шаттлов в электрохимических процессах является возможность применения суспензионных культур, так как в этом случае не

требуется прямого контакта клеток с электродом. К недостаткам можно отнести высокую цену шаттлов, особенно при масштабировании, их нестабильность, а иногда токсичность.

Если транспорт электронов с помощью синтетических экзогенных переносчиков могут осуществлять практически все бактерии, то лишь немногие способны передавать их непосредственно на твердые поверхности, в частности, на электроды. Бактерии, способные осуществлять ЕЕТ, называют электрогенами. Среди электрогенов наиболее изучены грамотрицательные бактерии *Geobacter sulfurreducens* и *Shewanella oneidensis*. Однако к ЕЕТ способны многие представители и грамположительных бактерий, например, некоторые виды *Clostridium*, а также архей, дрожжей и микроводорослей [17].

В многочисленных исследованиях *Geobacter* и *Shewanella* показано, что экзогенный транспорт электронов у этих микроорганизмов связан с полигемными цитохромами. Геном *S. oneidensis* содержит гены для 42 таких цитохромов [18], а геном *G. sulfurreducens* – 110 [19]. На рис. 3 приведена обобщенная схема транспорта электронов с цитоплазматической мембраны к электроду для бактерий *G. sulfurreducens* и *S. oneidensis*.

Путь электронов из клетки на анод начинается с полигемных цитохромов, локализованных в цитоплазматической мембране и собирающих электроны, которые образуются при окислении убихинонов этой мембраны. В случае *S. oneidensis* это белок СумА, в случае *G. sulfurreducens* – белок МасА. Полигемные цитохромы содержат от 2 до 12 гемов, каждый из которых имеет собственный окислительно-восстановительный потенциал. Электроны всегда движутся от более отрицательного к более положительному потенциалу. У цитохромов есть гемы с более низким и более высоким потенциалом: первые служат для «входа» электрона в белок, вторые – для его «выхода».

Во внешней мембране расположены трансмембранные белковые комплексы, содержащие полигемные цитохромы. Для *S. oneidensis* это порин MtrB, образующий пору, и декагемный цитохром MtrA, который одной своей частью погружен в пору и экспонирован в периплазму, а другой «смотрит» во внешнюю среду. С этим комплексом связан и другой полигемный цитохром MtrC. У *G. sulfurreducens* во внешней мембране локализованы цитохромы OMCZ, OMCS и OMCE. Периплазма бактериальной клетки представляет собой достаточно широкое пространство, по которому невозможен прямой транспорт электронов от ци-

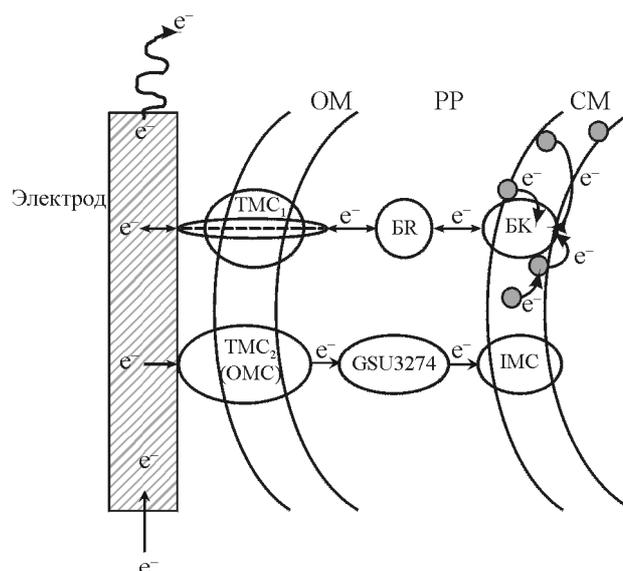


Рис. 3. Схема внеклеточного транспорта электронов у *Shewanella oneidensis* (верхняя часть рисунка) и *Geobacter sulfurreducens* (нижняя часть рисунка): ОМ – внешняя мембрана; РР – периплазма; СМ – цитоплазматическая мембрана; ● – убихиноны цитоплазматической мембраны; БК – белки (цитохромы), собирающие электроны в цитоплазматической мембране; BR – белки-переносчики электронов через периплазматическое пространство; TMC₁ и TMC₂ – трансмембранные комплексы, обеспечивающие транспорт электронов через внешнюю мембрану и контакт с электродом у *S. oneidensis* и *G. sulfurreducens*, соответственно. Обратный транспорт у *S. oneidensis* осуществляется путем обращения прямого транспорта; у *G. sulfurreducens* для этого используется другой путь, включающий OMC, GSU3274 и IMC.

Fig. 3. Scheme of electron extracellular transfer in *Shewanella oneidensis* (the upper part of the figure) and *Geobacter sulfurreducens* (the lower part of the figure): OM, outer membrane; PP, periplasm; CM, cytoplasmic membrane; ●, ubiquinones of cytoplasmic membrane; БК, proteins (cytochromes) that accumulate electrons in cytoplasmic membrane; BR, protein electron transporters through cytoplasmic space; TMC₁ and TMC₂, transmembrane complexes providing electron transfer through outer membrane and contact with electrode in *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens*, respectively. In *S. oneidensis*, the backward transfer is realized by the reversal of the forward transport; in *G. sulfurreducens*, different pathway including OMC, GSU3274 and IMC is used to this purpose

тохромов, локализованных в цитоплазматической мембране, к цитохромам внешней мембраны. Транспорт электронов между ними осуществляют небольшие периплазматические цитохромы: для *Shewanella* – STC, а для *Geobacter* – PpcA. Вышеприведенная картина сложилась в результате многочисленных работ, посвященных выделению белков, анализу транскриптомных и протеомных данных и изучению мутантов с делециями цитохромных генов [20, 21]; на рис. 3, таким образом, приведена сильно упрощенная схема ЕЕТ.

Функции части цитохромов могут дублироваться. Так, делеция генов, кодирующих белки MtrA, MtrB и MtrC *S. oniedensis*, снижает, но не прекращает внеклеточный транспорт электронов. Возможно, функцию этих цитохромов компенсируют их гомологи MtrD, MtrE и MtrF [22].

Вышеприведенные исследования касались транспорта электронов из клетки на анод. Интересно было выяснить, будет ли использоваться тот же путь для транспорта электронов в обратном направлении – от катода к клетке. В некоторых случаях так и происходит. Так, было показано, что если к биопленке *S. oniedensis* на катоде (при напряжении $-0,36$ В) добавить фумарат, в системе немедленно возникает ток за счет восстановления фумарата в сукцинат. Делеция гена фумаратредуктазы прекращает поток электронов, как и делеция гена MtrB – порина, важного для системы транспорта электронов. Ток также прекращается, если делетировать ген *СумА*. Низкомолекулярные шаттлы восстанавливают ток лишь незначительно. Сумма этих данных указывает, что у *Shewanella* система транспорта электронов обратима и электроны с катода попадают сначала в пул убихинонов цитоплазматической мембраны, а затем оттуда к растворимой периплазматической фумаратредуктазе Fсс [23].

Совсем другая картина наблюдается у *G. sulfurreduceus*. Было проведено сравнение транскриптом пленок бактерий, растущих на графитовом катоде в условиях отсутствия тока и производства тока и его потребления. Показано, что при генерации тока у *G. sulfurreduceus* активируются гены белков, связанных с транспортом электронов (см. рис. 3), но эта активация отсутствует в биопленках, потребляющих ток. В последних активирован ген моногемного цитохрома GSU3274. Делеция этого гена прекращает транспорт электронов с катода, в то время как делеция генов белков, вовлеченных в транспорт электронов на анод (OMCZ, OMCS, OMCB (см. рис. 3)), никак не сказывается на поглощении электронов клетками [24]. Таким образом, у *G. sulfurreduceus* механизмы транспорта электронов в клетку и из клетки различны.

В 2005 г. был открыт совершенно новый механизм ЕЕТ у *G. sulfurreduceus* – через электропроводные пили, получившие название нанопроволок (nanowires) [25]. Вскоре нанопроволоки обнаружили и у *S. oniedensis* и у ряда других организмов [26].

Несмотря на многочисленные публикации, молекулярный механизм электропроводности до

сих пор достоверно не установлен. Более того, были серьезные сомнения в существовании электропроводных пилей у *Shewanella*. Как правило, нанопроволоки наблюдают и исследуют в высушенных образцах методами силовой и электронной микроскопии. Не исключено, что наблюдаемые нанопроволоки – это артефакты, возникающие при высушивании и связанные с конденсацией внеклеточного полимерного матрикса [27]. Только в 2014 г. была опубликована работа, где наблюдали выросты на клетках *Shewanella in vivo*. С использованием методов иммунодетекции было показано, что в этих выростах содержатся цитохромы Mtr-комплекса внешней мембраны. Далее проводили наблюдение тех же клеток после фиксации в силовом микроскопе. По утверждению авторов, при определенных условиях клетки *Shewanella* меняют форму, образуя достаточно протяженные выпячивания, которые содержат цитоплазму, цитоплазматическую и внешнюю мембраны [28]. Предполагается, что электроны могут двигаться вдоль таких структур, или пилей, на которых сорбированы цитохромы, методом «прыжков» от цитохрома к цитохрому (рис. 4).

На самом деле для осуществления таких «прыжков» расстояние между цитохромами не должно превышать 0,7 нм [29]. Нет ни одного экспериментального факта, подтверждающего такое плотное расположение цитохромов. Если назначение нанопроволок состоит в передаче электронов на значительное расстояние от клетки к клетке или в узкие поры (в составе геологических пород), то выросты *Shewanella* могут выполнять такие функции непосредственно через внешнюю мембрану без передачи электронов вдоль по выросту (см. рис. 4).

У *Geobacter* нанопроволоки, скорее всего, реально существуют, и образованы они пилями типа IV [25]. С такими пилями ассоциированы цитохромы, но их денатурация не приводит к снижению электропроводности, т.е. они прямо не участвуют в осуществлении функции электропроводности пилей [30]. Есть обоснованное предположение, что электропроводность пилей у *Geobacter* обеспечивается тем, что кластеры из пяти ароматических аминокислот, входящие в состав С-концевых областей пилина, при полимеризации этого белка и образовании пилей располагаются близко друг к другу, например стопкой так, что π - π -орбитали ароматических остатков перекрываются, обеспечивая металлоподобную электропроводность вдоль пилей [31]. Важность ароматических кластеров подтверждается тем, что

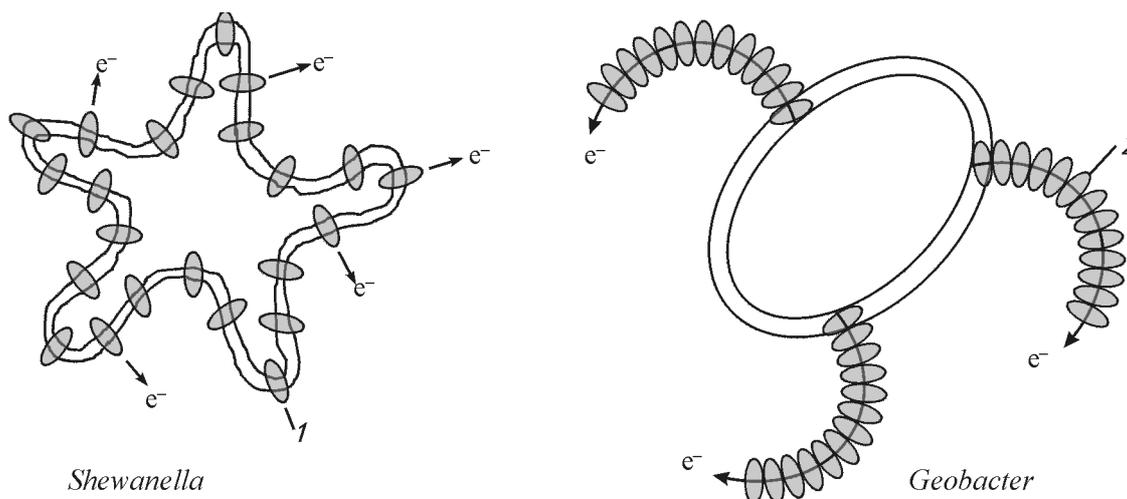


Рис. 4. Схема электропроводных пилей (нанопроволок) у электрогенных бактерий: 1– цитохромы внешней мембраны, способные передавать электроны от клеток *Shewanella* на твердые поверхности; 2 – кластеры ароматических аминокислот пилина в клетках *Geobacter*, образующие стопки и обеспечивающие электропроводность вдоль пилей

Fig. 4. Scheme of electrically conductive pili (nanowires) in electrogenic bacteria. Outgrowths containing cytoplasm, cytoplasmic membrane and outer membrane in *Shewanella*: (1), cytochromes of outer membrane capable of electron transfer onto dense surfaces. In *Geobacter*, pili are formed by the pilin polymerization: (2), pilin contains stacks of aromatic amino acid clusters that provide electric conductivity along pili

замена любой из входящих в их состав аминокислот на аланин приводит к утрате пилиями электропроводности, хотя на них и сорбированы цитохромы [31]. Недавно методом рентгеновской микродифракции в синхротроне было подтверждено наличие периодичности (3,2 Å) в структуре электропроводящих пилей бактерий и отсутствие этой периодичности у непроводящих элементов [32]. Свойства пилей *Shewanella* и *Geobacter* обсуждаются в ряде обзоров [17, 33–35].

Внеклеточный электронный транспорт постулирован, а иногда и доказан для ряда других микроорганизмов (например, для *Clostridia*, метаногенов, *Acidithiobacillus ferrooxidans*), но механизмы этого транспорта изучены мало. Если у *A. ferrooxidans* в него вовлечены цитохромы, то некоторые представители р. *Clostridia* цитохромов не содержат, и, следовательно, в транспорте электронов у них участвуют другие белки, возможно, дегидрогеназы [35].

Для передачи электронов на электроды без использования низкомолекулярных шаттлов клетки электроактивных бактерий должны физически контактировать с поверхностью электродов. Обычно такие бактерии образуют на электродах биопленки (EABs).

В биотехнологических системах часто используют не чистые культуры микроорганизмов, а сложные микробные ассоциации. Для определения со-

става биопленок, образованных такими ассоциациями, и изучения динамики их изменения широко применяют современные методы молекулярной биологии и генетики, такие как фингерпринтинг, пиросеквенирование, анализ 16S РНК и др. [36].

Лучше всего изучены биопленки бактерий р. *Shewanella* и *Geobacter*. Толщина биопленки р. *Geobacter* может достигать 100 мкм. Биопленки обоих типов обладают заметной электропроводностью, которая в случае *Geobacter* обеспечивается исключительно прямым ЕЕТ, а в случае *Shewanella* – как прямым, так и опосредованным флавинами транспортом электронов. Напомним, что мутации *Shewanella*, прекращающие синтез флавинов, снижают транспорт электронов в биопленках на 70–75% [37].

Для изучения электрических свойств биопленок применяют такой метод, как циклическая вольтамперометрия (CVS) [38,39]. Для исследования структуры и толщины биопленок используют конфокальную лазерную микроскопию и сканирующую электронную микроскопию [30]. Ультрафиолетовая и световая микроскопия используется для характеристики цитохромов в биопленке [40].

Методами циклической вольтамперометрии было показано, что в биопленках *G. sulfurreducens* осуществляется прямой транспорт электронов между клетками, и этот транспорт был обусловлен накоплением восстановительных форм

цитохромов [41]. Наличие такого транспорта обеспечивает попадание на электрод электронов из тех клеточных слоев, которые не прилегают непосредственно к данному электроду. Было показано, что плотность тока в МФС растет с увеличением толщины пленки, образованной бактериями *G. sulfurreducens* [42]. Недавно была предложена математическая модель, количественно описывающая поведение биопленки *G. sulfurreducens* на электродах: она связывает значения скорости метаболизма бактерий и транспорта электронов в биопленке, плотность тока и другие параметры этой биоэлектрохимической системы [43].

Таким образом, формирование и свойства биопленок решающим образом влияют на процессы в BES-системах. Передача электронов между биопленкой и электродами – это взаимодействие между живыми организмами и неорганическим материалом, которое уже реализуется в биосенсорах [44, 45].

ПРОДУКЦИЯ ВОДОРОДА В МЕС

Водород широко применяется в химической промышленности. Мировое производство этого газа в 2012 г. составило 55 млн т. Основное количество водорода расходуется на получение аммиака и метанола и на десульфуризацию моторного топлива. Водород рассматривается как перспективное экологически чистое топливо. На сегодня 96% водорода получают реформингом природного газа и только около 4% электролизом воды [46]. Электролиз дает водород высокого качества, однако этот процесс энергозатратен: электроэнергия, расходуемая на электролиз воды, вдвое выше энергии, запасенной в водороде [46].

Оказалось, что получение водорода в МЕС (см. рис. 1) энергетически значительно выгоднее, чем путем электролиза, особенно, если в качестве источника органических соединений в анодной камере используются разнообразные стоки, которые одновременно проходят процесс очистки в микробной электролизной ячейке. Такая система получила название микробного биоэлектрохимического реактора (BEAMR) [47]. Реакции в катодной камере МЕС не отличаются от реакций, происходящих в обычном абиогенном электролизном аппарате. Однако часть энергии в элементе дополнительно образуется за счет окисления органических веществ в анодной камере и энергия, затраченная на получение водорода, оказывается вследствие этого меньше, чем суммарная энергия на выходе из МЕС, а получение водорода в этих

условиях становится энергетически выгодным процессом. Минимальный термодинамический потенциал для электролиза воды равен 1,23 В, а на практике обычно применяют потенциал в 4,0–5,5 В [48]; стандартный потенциал для восстановления водорода составляет 0,414 В (см. таблицу). В то же время, BEAMR-системы имеют внешний потенциал 0,2–0,6 В и потенциал на катоде 0,45–0,8 В [49].

Более высокая эффективность МЕС при получении водорода в сравнении с абиогенным электролизом во многом зависит от снижения внутреннего сопротивления системы и, в частности, потерь напряжения на мембранах, а также уменьшения перенапряжения на электродах, особенно на катоде. Наименьшим перенапряжением характеризуются платиновые электроды, но они малоприменимы при масштабировании процессов из-за их дороговизны. На протяжении последних 20 лет предпринято много попыток усовершенствования процесса биоэлектрохимического получения водорода. Так, замена ионоселективной мембраны на осмотическую (FO – forward osmosis) снижает внутреннее сопротивление МЕС и увеличивает скорость образования водорода приблизительно в 3 раза [50].

Были предложены разные конфигурации МЕС, в том числе однокамерная система без мембраны [51]. При замене платинового катода на никель-молибденовый в однокамерном МЕС были достигнуты достаточно высокие показатели продуктивности – 2 м³ водорода в день на 1 м³ объема реактора [52].

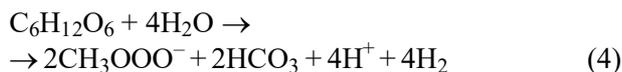
Способность некоторых микроорганизмов катализировать выделение водорода на катоде открыла новые перспективы для решения проблемы его получения. В 2008 г. Rozendal и др. вырастили на аноде биопленку микроорганизмов, окисляющих ацетат и водород, а затем использовали этот электрод в качестве катода в МЕС. При приложении потенциала 0,7 В на катоде образовывался водород с кулоновской эффективностью в 49% [53]. В некоторых случаях эта величина при получении водорода в МЕС с биокатодом достигает 80–90% [54].

Продолжаются исследования состава микроорганизмов в биопленках на катоде. Большая часть микроорганизмов в таких биопленках относится к р. *Proteobacteria* [55]; однако на термостабильном биокатоде, работающем при 55°C, до 77% микроорганизмов биопленки принадлежало к группе *Firmicutes* [56].

До сих пор ни в одном случае не расшифрован молекулярный механизм транспорта электро-

нов и их участия в метаболизме при электробиологическом получении водорода. Предполагается, что первичными акцепторами электронов в клетке могут быть цитохромы или непосредственно дегидрогеназы, вовлеченные в восстановление H^+ в H_2 [37, 57].

Дополнительное напряжение для функционирования МЕС, продуцирующих водород, может подаваться из любых источников, включая ветровую и солнечную энергию [58]. Интересным вариантом является использование в качестве внешнего источника тока МФС [59]. Так, была описана система, в которой целлюлоза подвергалась гидролизу и темновой ферментации консорциумом микроорганизмов, результатом которых являлось образование водорода и летучих жирных кислот, главным образом, ацетата (уравнение (4)), а культуральная жидкость после ферментации использовалась для питания батареи из трех МФС. Мощности такой батареи хватает для получения водорода в МЕС. Выход водорода при этом увеличивается на 41% по сравнению с простой темновой ферментацией [60].



Несмотря на энергетическую эффективность получения водорода в МЕС, недостаточная скорость его образования и высокая цена электродов и мембран ограничивают широкое промышленное применение процесса. Департамент энергетики США рассчитал, что для достижения цены водорода около 2 долл. за 1 кг (современная мировая цена) скорость образования водорода в МЕС должна составлять 4 л газа/л реактора в день и цена катода не должна превышать 50 долл. за 1 м² [61]. Перспектива достижения таких показателей вполне реальна и может быть отнесена к среднесрочным прогнозам [62].

Водород, полученный путем биоэлектролиза, может далее использоваться для фиксации углекислого газа различными методами: 1) восстановление до органических кислот и других многоуглеродных соединений (электробиосинтез); 2) восстановление до метана (электрометаногенез); 3) продукция биомассы и ценных химических соединений водородокисляющими бактериями.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ЭЛЕКТРОБИОСИНТЕЗЕ

Водородокисляющие бактерии растут аэробно, восстанавливая углекислый газ за счет газооб-

разного водорода, и черпают энергию из окисления водорода кислородом. Большинство работ с водородокисляющими бактериями было выполнено с использованием вида *Ralstonia eutropha* (современное название *Cupriavidas necator*). Для фиксации углекислого газа эти бактерии, как и фотосинтезирующие растения, используют цикл Кельвина [63]. Известна последовательность генома *C. necator* [64].

При аутотрофном росте водород используется водородокисляющими бактериями и для восстановления углекислого газа, и на обеспечение энергетики клетки. Очевидно, что соотношение H_2 , CO_2 и O_2 в газовой смеси влияет на скорость роста бактерий и энергетическую эффективность использования водорода для биосинтеза биомассы (количество химической энергии водорода, запасенной в синтезируемой биомассе). Экспериментально было показано, что при низкой концентрации углекислого газа, избытке H_2 и различных концентрациях O_2 скорость потребления указанных газов растет с ростом концентрации кислорода, но при этом снижается энергоэффективность восстановления углекислого газа. При концентрации кислорода в 10 моль% энергоэффективность биосинтеза биомассы достигает 50%, т.е. 50% химической энергии водорода сохранено в биомассе бактерий [65].

Если составить цепочку последовательных систем преобразования солнечной энергии, первым звеном которой является солнечная батарея с эффективностью около 20% [66], вторым – система получения водорода с помощью электролиза воды (с эффективностью около 50%), а третьим звеном – система синтеза биомассы водородокисляющими бактериями, эффективность которой составляет 50%, то суммарно 5% солнечной энергии в такой цепи аккумулируется в виде биомассы. При этом известно, что фотосинтез большинством растений осуществляется с эффективностью ниже 1% [67].

Отличительной особенностью бактерий *C. necator* является их способность накапливать при определенных условиях большие количества биодеградируемых биополимеров – полигидроксиалканоатов, главным образом, полигидроксибутирата. В 2014 г. была опубликована работа по генно-инженерной модификации этой бактерии с целью придания ей способности синтезировать изопропанол, который может служить полезной окисляющей добавкой в моторное топливо. У модифицированного штамма был перекрыт путь биосинтеза из ацетил-КоА к полигидроксибутирату и

активирован путь последовательного превращения этого соединения в ацетоацетат и ацетон (с выделением углекислого газа) и затем восстановления ацетона в изопропанол [68].

Исследователи Гарвардского университета (США) создали комплексную установку, в которой электролиз воды с помощью энергии солнечных батарей сочетался с ростом бактерий *C. necator*, синтезирующих изопропанол. Для снижения перенапряжения и возможности масштабирования процесса были подобраны электроды, способные работать в нейтральной водной среде, биосовместимые и содержащие широко распространенные химические элементы (фосфат кобальта для анода и сплав NiMoZn для катода). К сожалению, авторы были вынуждены использовать напряжение свыше 2,7 В, так как меньшее напряжение приводило к образованию токсичных соединений, содержащих активный кислород. Высокое напряжение явилось причиной низкой энергоэффективности – около 3,2% по биомассе и 0,7% по изопропанолу, но эта величина все равно выше, чем получаемая при использовании растительной биомассы [69].

Экономический расчет показывает, что продукция моторного топлива с помощью водородоокисляющих бактерий может стать рентабельной при стоимости электроэнергии около 2 центов за 1 кВт; современные тарифы в 3–7 раз превышают этот показатель [70]. Возможно, более рациональным является применение водородоокисляющих бактерий для синтеза белка одноклеточных, которым можно обогащать корма сельскохозяйственных животных [71].

Использование водорода в различных сферах экономики имеет ряд трудностей – взрывоопасность при контакте с кислородом требует особых условий транспортировки, а плохая растворимость в воде снижает скорость процесса биосинтеза. Альтернативой водороду может стать муравьиная кислота, получаемая путем электролиза. При подаче углекислоты в катодную камеру муравьиная кислота образуется при тех же потенциалах, что и водород (около 0,414 В) (см. таблицу). Муравьиная кислота хорошо растворима в воде, легко транспортируется, слаботоксична и может использоваться метилотрофными микроорганизмами в качестве субстрата. В литературе есть даже спекуляции на тему «экономики на базе муравьиной кислоты» [72, 73]. Однако с энергетической точки зрения у муравьиной кислоты в качестве субстрата для микроорганизмов нет преимуществ перед водородом.

ЭЛЕКТРОМЕТАНОГЕНЕЗ

В природе восстанавливать углекислый газ до метана способны только метаногенные археи, для роста которых существует очень узкий круг субстратов – вода, углекислый газ и C₁-соединения. Природный метаногенез осуществляется в анаэробных условиях сложной ассоциацией различных микроорганизмов, состоящей из бродильщиков, вторичных бродильщиков (протоноредукторов) и метаногенных архей. Именно вторичные («синтрофные») бродильщики снабжают археи водородом, используемым для восстановления углекислого газа до метана [74].

Двуокись углерода может также быть восстановлена до метана на биокатоде МЕС. Этот процесс получил название электрометаногенез [75]. В данном исследовании катод был инокулирован смесью бактерий из метантенка. После длительного культивирования в МЕС при потенциале катода от –0,7 В до –1,0 В (против электрода Ag/AgCl) доминирующими микроорганизмами оказались археи *Methanobacterium palustre*.

Преимуществом электрометаногенеза является высокая энергоэффективность. Так, в рассматриваемой работе [75] она составляла 80%. Другое преимущество состоит в том, что МЕС могут использовать стоки с низким содержанием органических компонентов, тогда как обычный метаногенез требует их высокой концентрации [76].

Метаногенез на катоде может осуществляться чистой культурой, что было показано на примере морской литотрофной археи (*Methanobacterium-like archae M-1*) [77]. Энергоэффективность при этом достигала 80%, хотя скорость процесса была небольшой (350 нмоль/(см² сут)). Электронная микроскопия обнаружила на графитовом катоде отдельные бактерии, не образующие сплошной биопленки, что, возможно, объясняет низкую скорость продукции метана.

С практической точки зрения интересно использование термофильных архей в процессе электрометаногенеза. В работе [78] достигнута высокая скорость синтеза (1130 ммоль/(м² сут)) и высокая энергоэффективность (90%) процесса при температуре 55°C и напряжении на катоде –0,88 В. Хотя минимальное напряжение на катоде для образования метана составляет –0,24 В (см. таблицу), в большинстве работ используют более высокий отрицательный потенциал на катоде (от –0,6 до –1,2 В). Показано, что оптимальным напряжением для графитового катода является –0,86 В; при более низком потенциале наблю-

дается разрушение клеток и снижение уровня метаногенеза [79].

Долгое время обсуждается вопрос о том, осуществляется ли прямой транспорт электронов с катода к клеткам архей или на катоде образуется водород, который служит переносчиком электронов. Аргументом в пользу прямого переноса служит отсутствие детектируемых количеств водорода в катодном пространстве, однако это слабый довод, так как текущая концентрация водорода может быть очень низкой. Другой аргумент состоит в том, что при используемом напряжении абиотическое образование водорода на катоде невозможно. Этот довод также неоднозначен, так как наличие микроорганизмов на катоде снижает перенапряжение электрода.

Веские доказательства существования прямого транспорта электронов содержатся в работе по исследованию мутантов архей, не способных к синтезу метана с использованием водорода [80]. В работе сравнивали электрометаногенез дикого штамма *Methanococcus maripaludis* и мутанта MM1284, у которого осуществлена (в рамках считывания) делеция 5 катаболических дегидрогеназ (*fru*, *fre*, *hmd*, *vhu*, *vhc*) и одной анаболической дегидрогеназы *ehb*. В работе сравнивали электрометаногенез дикого штамма *Methanococcus maripaludis* и мутанта MM1284, несущего делецию пяти катаболических дегидрогеназ (*fru*, *fre*, *hmd*, *vhu*, *vhc*) в рамках считывания, и одной анаболической дегидрогеназы *ehb*. Мутант был не способен к росту на водороде и углекислом газе и образованию метана. Сразу после того, как суспензию клеток помещали на катод ($-0,6$ В), начиналось выделение метана, но его количество было в 10 раз меньше, чем в случае архей дикого типа. Интересно, что при переходе к потенциалу $-0,7$ В на катоде скорость метаногенеза у клеток дикого типа росла вместе со скоростью образования водорода, а у мутанта оставалась на постоянном уровне.

Данная работа показала, что прямой транспорт электронов при электрометаногенезе существует, хотя он, вероятно, и не является главным механизмом передачи электронов от катода к клеткам. Механизм поглощения электронов археями при прямом электронном транспорте с катода неизвестен. Авторам также не удалось установить, осуществляется ли рост клеток при метаногенезе [80].

Интересно, что есть данные о наличии прямого переноса электронов DIET (Direct Interspecies Electron Transfer) между различными видами бактерий [81]. Так, было показано, что бактерия

Geobacter metallireducens, окисляющая этанол, не способна к образованию водорода или муравьиной кислоты, но может передавать электроны метаногенам таких видов бактерий как *Methanosaeta harundinacea* [82] или *Methanosarana barkeri* [83], которые образуют метан при совместном культивировании с *G. metallireducens*. Совместное культивирование этих бактерий приводит к образованию электропроводных агрегатов [81]; при этом мутанты *Geobacter*, лишённые электропроводных пилей, не способны к формированию агрегатов и синтропному образованию метана [82, 83]. Таким образом, понятно, что транспорт электронов от электрогенов происходит через электропроводные пилы и поверхностные полигемные цитохромы. Однако механизм акцепции электронов и их дальнейшего метаболизма при DIET до конца неизвестен, как и при переносе электронов с катода.

Несмотря на такие бреши в фундаментальном понимании процесса электрометаногенеза, публикуются многочисленные работы по совершенствованию электродов, конструкции электролизных ячеек, а также характера и параметров процесса [84–86]. Более того, данная технология нашла практическое применение в очистке сточных вод пивоваренных заводов. Американская компания Cambrian Innovation продала и смонтировала первую промышленную установку на базе МФС производительностью около 200 кВт/ч на пивоваренном заводе в Калифорнии в 2013 г. (установка названа EcoVolt). В 2015–2016 г. такие установки купили еще два пивоваренных завода. Они очищают производственные стоки (БПК снижается примерно на 80%), производят метан, используя при этом электричество, поступающее от микробного элемента, и углекислый газ, образующийся в процессе брожения. Установка покрывает около 5 потребности завода в энергии и должна окупиться за четыре года.

ЭЛЕКТРОБИОСИНТЕЗ МНОГОУГЛЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

В 2010 г. опубликована основополагающая работа, в которой показано, что ацетогенная бактерия *Sporomussa ovata* в виде биопленки на катоде способна акцептировать электроны с этого электрода и синтезировать уксусную кислоту [87]. Электросинтез осуществлялся при потенциале катода -400 мВ (против стандартного водородного электрода). Катод представлял собой гладкий графитовый стержень, на котором водород может об-

разовываться только при потенциале -600 мВ. Биопленку сначала выращивали путем культивирования бактерий в газовой смеси водород/углекислый газ (ацетогены могут литотрофно расти на такой смеси). Жидкая среда несколько раз заменялась для удаления планктонной культуры. Затем прежняя газовая смесь была заменена новой, состоящей из N_2 и CO_2 (20:80). При проточке среды в такой системе наблюдали ток и образование на катоде уксусной кислоты. Синтез осуществляли в течение 30 дней. Через 6 сут количество образовавшейся уксусной кислоты составляло всего около 1 ммоль, т.е. скорость синтеза была низкой. Однако кулоновская эффективность процесса доходила до 85%, т.е. 85% электронов участвовали в восстановлении углекислого газа в уксусную кислоту [87]. Вскоре было показано, что некоторые другие ацетогены, такие как *Sporomus-sa sphaeroides*, *Sporomus-sa silvacetica*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium aceticum*, *Moorella thermo-acetica* и др., также способны к электросинтезу ацетата. Однако скорость процесса у этих бактерий была в 10–20 раз ниже, чем у *S. ovata* [88].

Ацетогены – это гетерогенная в таксономическом отношении группа грамположительных бактерий следующих родов: *Pentostreptococcus*, *Butyrobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Sporomus-sa*, *Syntrophococcus* и др. Отличительной чертой ацетогенов является способность к литотрофному росту на смеси газов водород и углекислый газ или CO и углекислый газ, или водород, CO и углекислый газ и наличие у них биохимического пути фиксации углекислого газа, называемого путем Вуда–Льонгдала (Wood–Ljungdahl Pathway, WLP) [89] (рис. 5). Основным продуктом метаболизма ацетогенов является уксусная кислота, с чем и связано их название, но часто они синтезируют также этанол и в небольших количествах 2,3-бутандиол. Ацетогены вовлечены в геохимический цикл углерода; до 20% углерода почвы подвергается действию ацетогенов, и они синтезируют ежегодно около 1 млрд. т уксусной кислоты [90].

В отличие от других путей фиксации углерода, которые являются циклическими, WLP представляет собой линейную последовательность реакций, состоящую из двух ветвей, метильной и карбонильной (см. рис. 5). В метильной ветви в ряде последовательных реакций 1 моль CO_2 восстанавливается до метильной группы с расходом одной молекулы АТФ. В карбонильной ветви CO_2 восстанавливается до CO. Ключевой ферментный комплекс пути – карбонилдегидро-

геназа/ацетил-КоА-синтаза – участвует в образовании ацетил-КоА. Чаще всего последний превращается в ацетат с образованием эквимольного количества АТФ. Ацетил-КоА может также участвовать в различных анаболических и катаболических реакциях в бактериальной клетке. У ацетогенов ацетил-КоА превращается в ацетилфосфат и КоА с помощью фосфотрансацетилазы. Ацетилфосфат конвертируется в ацетат ферментом ацетилкиназой с одновременным синтезом одной молекулы АТФ.

Так как одна молекула АТФ расходуется в метильной ветви WLP и одна молекула АТФ образуется в последующих реакциях пути, в целом WLP энергетически полностью сбалансирован на уровне субстратного фосфорилирования. Долго оставалось непонятным, откуда же в таком случае ацетогены черпают энергию. Оказалось, что источником энергии является ионный мембранный градиент, чаще всего протонный (у *Acetobacter woodi* это Na^+ -градиент). При синтезе одной молекулы уксусной кислоты ацетогены запасают от 0,3 до 0,5 молекул АТФ (см. суммарное уравнение реакций пути на рис. 5) [91].

Предпринят ряд исследований, направленных на ускорение реакции электробиосинтеза ацетогенами. При этом важную роль играет оптимизация содержания микроэлементов, так как многие ферменты ацетогенов являются металлоферментами. Так, оптимизация содержания вольфрама (WO_4^{2-}) в среде культивирования бактерий *Sporomus-sa ovata* привела к ускорению биоэлектросинтеза уксусной кислоты из углекислого газа в 4,4 раза. Известно, что вольфрам необходим для активности форматдегидрогеназы (FDH), первого фермента в процессе фиксации углекислого газа в WLP [92].

Успешным оказался подход, получивший название лабораторной эволюции. Штамм *Sporomus-sa ovata* в течение двух месяцев путем 18 пересевов адаптировали к росту на среде с возрастающей концентрацией метанола. Конечный штамм, названный met-T18-2, имел в 5 раз более высокую скорость роста и в 6,5 раз большую скорость продукции ацетата из углекислого газа при росте на катоде, чем исходный штамм. Секвенирование полного генома полученного продуцента в сравнении с исходным штаммом позволило обнаружить у первого 33 мутации. Трудно однозначно определить ключевые мутации в ускорении литотрофного метаболизма *S. ovata*. Можно предположить, что это мутации, обусловившие повышенную устойчивость к метанолу (затрагивающие

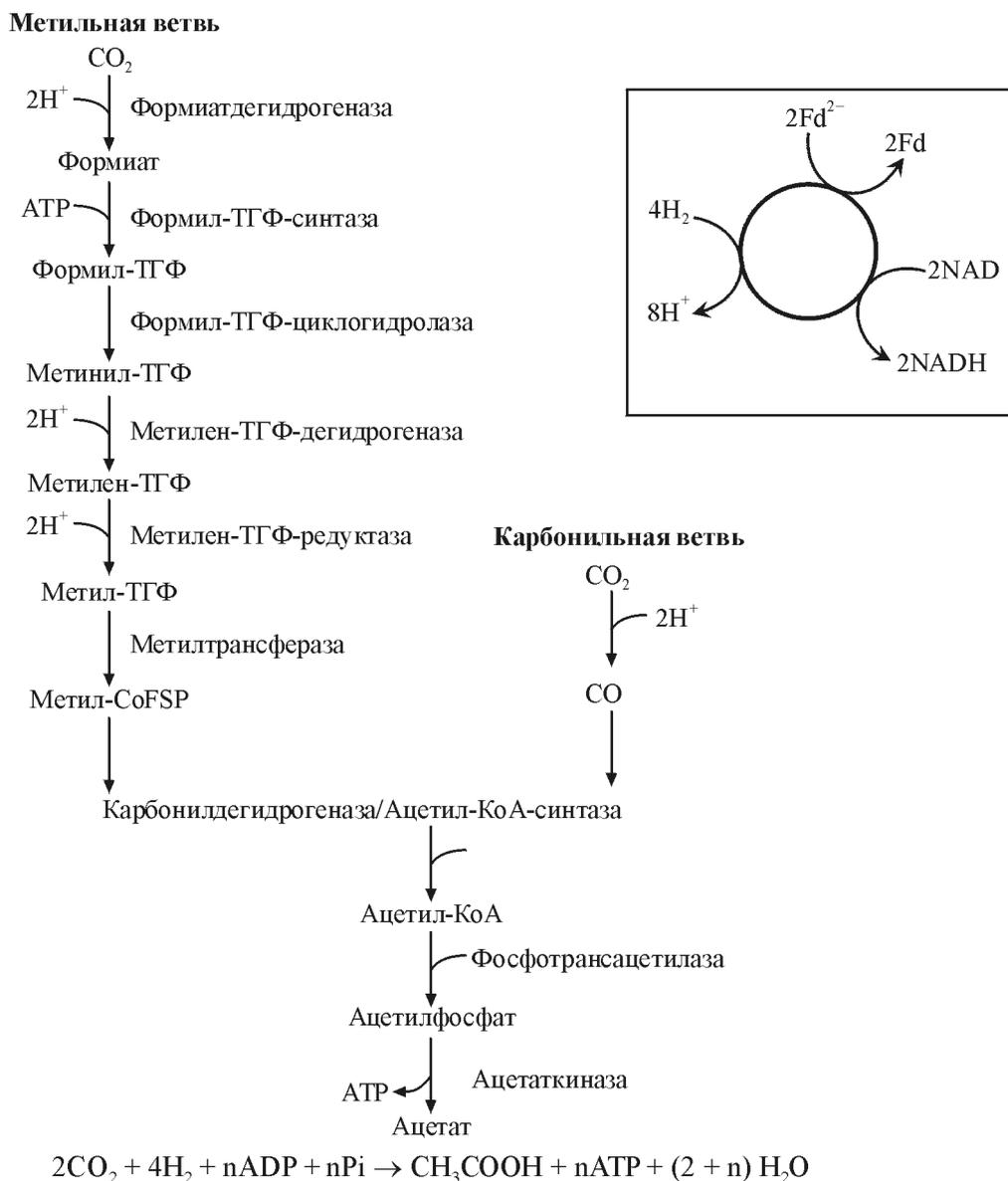


Рис. 5. Биохимический путь Вуда–Лjungдала у ацетогенных бактерий [по 91]. Специальный комплекс ферментов (в рамке), окисляя водород, восстанавливает ферредоксин и NAD. Восстановленный ферредоксин является движущей силой при создании ионного градиента, который служит источником энергии для ацетогенов. Под схемой – общее уравнение пути

Fig. 5. The Wood–Ljungdahl pathway in acetogenic bacteria [91]. A special enzyme complex reduces ferredoxin and NAD via the hydrogen oxidation (the complex is shown in a frame in the top right portion of the figure). Reduced ferredoxin is a driving force for the creation of ionic gradient that is an energy source for acetogens. The common equation of the pathway is represented under the scheme.

шапероны и структуру клеточной стенки), а также ответственные за интенсификацию экспрессии генов для ферментов пути Вуда–Лjungдала. Были затронуты гены транскрипционных факторов, строгого контроля, ДНК-репликации [93].

При определенных условиях смешанные культуры синтезируют уксусную кислоту в электрохимических реакциях с большей скоростью, чем чистые. Обычным источником смешанных культур являются метантенки. Учитывая, что восстановление углекислого газа до метана термодинамически более благоприятно, чем восстановление углекислого газа до ацетата, в смешанных культурах метаногенез обычно подавляют с помощью ингибитора 2-бромэтансульфоната [94]. Смешанную культуру также обогащают ацетогенами в результате роста на газовой смеси – углекислый газ и водород, а затем формируют биопленку культуры

тур являются метантенки. Учитывая, что восстановление углекислого газа до метана термодинамически более благоприятно, чем восстановление углекислого газа до ацетата, в смешанных культурах метаногенез обычно подавляют с помощью ингибитора 2-бромэтансульфоната [94]. Смешанную культуру также обогащают ацетогенами в результате роста на газовой смеси – углекислый газ и водород, а затем формируют биопленку культуры

на электроде. Оптимальный синтез ацетата происходит в биоэлектросистемах при рН в катодной камере, близком к 10 (добавление раствора бикарбоната) [94]. В этих условиях достигается достаточно высокая скорость биосинтеза ацетата ($1900 \text{ г}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут}^{-1})$) при кулоновской эффективности 58% [95] или $685 \text{ г}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут}^{-1})$ при кулоновской эффективности, близкой к 100% [96]. Следует отметить, что эти цифры получены после формирования биопленки и на достаточно коротком временном отрезке. После 24 ч инкубации наблюдали падение концентрации CH_3COOH вследствие потребления ацетата другими организмами [94].

Для эффективного электробиосинтеза помимо свойств самих микроорганизмов огромное значение имеют дизайн аппаратуры и свойства материала электродов. В процессе электробиосинтеза электроды не только прямо участвуют в обмене электронами с микроорганизмами, но и служат подложкой для образования биопленок. В этой связи электроды должны обладать биосовместимостью, большой поверхностью, высокой электропроводностью и способностью передавать электроны бактериальной клетке либо путем прямого контакта с ней, либо через контакт с низкомолекулярными переносчиками. Для масштабирования процесса материал электродов должен быть еще дешевле и экологичен.

В качестве такого материала чаще всего используют металлы (платина, титан, нержавеющая сталь) и графит в различных модификациях. Металлы обладают высокой электропроводностью, прочностью, легкостью обработки, но, как правило, низкой биосовместимостью. Сегодня для создания микробных элементов наиболее приемлемыми кажутся углеродные электроды, так как они характеризуются высокой биосовместимостью и достаточной электропроводностью. Их применяют в виде графитовых пластин и стержней, графитовой бумаги, фетра и пены. Для научных исследований чаще используют графитовые пластины, так как в этом случае легко определить площадь поверхности и следить за образованием биопленок. В промышленности применяют электроды с развитой поверхностью (графитовую пену, фетр и т.д.).

Возможно создание гибридных электродов, одновременно использующих высокую электропроводность металла и биосовместимость углерода, например, стальной электрод, покрытый тонким слоем углерода [97]. Важны не только материал электродов, но и структура поверхности на нанометровом уровне. Так, простое окисление стального войлока в пламени горелки изменяет

структуру окислов на поверхности металла, что резко улучшает адгезию микроорганизмов и приводит к усилению тока в МЕС [98]. Повышение шероховатости катода также приводит к увеличению эффективности биохимических реакций [99]. Удобным материалом для создания наноструктурированных поверхностей являются углеродные нанотрубки [100]. Проблемам совершенствования электродов для микробного биокатализа посвящен ряд современных обзоров [101, 102].

Для успешного электробиосинтеза важен и сам дизайн электросинтетического реактора. Традиционный для исследовательских лабораторий реактор, состоящий из анодной и катодной камер, разделенных ионоселективной мембраной, и содержащий катод, определенное напряжение на котором поддерживается с помощью потенциометра, трудно масштабировать из-за дороговизны мембран и электрического оборудования. Недавно предложена конструкция безмембранного аппарата, присоединенного к прямому источнику тока, который легко поддается масштабированию. Этот аппарат сохранял высокую кулоновскую эффективность при электробиосинтезе уксусной кислоты из углекислого газа бактериями *Sporomussa ovata* [103]. Различные конструкции реакторов для промышленного использования рассмотрены в обзоре [104].

Несмотря на значительные успехи в области исследования микробного электросинтеза, остаются неясными многие связанные с ним фундаментальные явления: не установлен молекулярный механизм транспорта электронов с катода к ацетогенам; не ясно, в какой точке электроны вовлекаются в метаболизм клетки.

Достигнутые значения скорости электробиосинтеза пока сильно уступают величинам, характерным для обычных ферментационных процессов. Интересным аспектом биоэлектрохимии является использование электродов для ускорения реакций микробного синтеза или изменения направления таких реакций.

ЭЛЕКТРОФЕРМЕНТАЦИЯ

Первые экспериментальные работы, в которых ферментацию осуществляли в присутствии электродов, датируются 1979 г. Японские исследователи показали, что электрод под напряжением 1,5 В и с плотностью тока $200\text{--}300 \text{ мкА}/\text{см}^2$, помещенный в ферментер, где бактерии *Brevibacterium flavum* осуществляли биосинтез L-глутаминовой кислоты из глюкозы, положительно влиял

на выход продукта. По сравнению с контролем (ферментация без электрического воздействия) выход L-глутаминовой кислоты увеличился на 10–15% [105, 106]. Авторы не уточнили механизм обнаруженного феномена, ограничившись предположением, что электроны продуцируют восстановительные эквиваленты. Электроды никогда не использовались в промышленной ферментации глутамата натрия, которая сегодня достигла в мире годовых объемов в 3 млн. т.

В литературе описан еще ряд опытов, когда при росте микроорганизмов в катодной камере наблюдалось увеличение выхода целевого продукта. Так, при культивировании *Corynebacterium glutamicum* на глюкозе в присутствии переносчика электронов (2,6-дисульфоантрахинона) и при потенциале на катоде –0,6 В (против Ag/AgCl) скорость роста бактерий снижалась, а выход молочной кислоты возрастал с 1,1 до 1,62 моль/моль глюкозы [107]. В ходе биосинтеза янтарной кислоты на очищенных гидролизатах кукурузных почерыжек бактериями *Actinobacillus succinogenes* в электролизной ячейке при потенциале –1,8 В наблюдали повышение выхода продукта на 3%, (с 6,95 г/л до 7,18 г/л) [108]. Авторы не обсуждают детальный механизм электробиосинтеза, но очевидно, что при данном потенциале наиболее вероятным является образование на катоде водорода, который и используется как восстановитель. В частности, известно, что водород может сдвигать ацетоно-бутанольную ферментацию в сторону более восстановленного продукта – бутанола. В 1988 г. было также показано, что этот сдвиг можно осуществить и в электрохимической ячейке, т.е. с помощью водорода, образующегося на катоде [109].

Единственным случаем, когда механизм феномена электробиосинтеза более или менее ясен, представляется описанный в данном обзоре процесс восстановления фумарата в сукцинат бактериями *Shewanella oniedensis* [23].

Электроды могут служить не только донорами, но и акцепторами электронов в процессе ферментации. Детальное исследование было проведено с электрогенной бактерией *Shewanella oniedensis* MR-I. Эта бактерия не усваивает глицерин и не растет на этом субстрате. В клетки *S. oniedensis* были введены три гена из *E. coli*, обеспечивающие транспорт глицерина в клетку, превращение его в глицеро-3-фосфат и далее в дигидроксиацетонфосфат. Последняя реакция осуществляется мембраносвязанной глицерофосфатдегидрогеназой. Полученные клетки все еще не были способны к росту на среде с глицерином. Лишь введение

четвертого гена, который экспрессировал триозофосфатизомеразу, обеспечило рост *S. oniedensis* на глицерине в аэробных условиях. Далее в клетки *Shewanella* были введены гены биосинтеза этанола (из *E. coli* и *Zymomonas mobilis*). Такие клетки могли усваивать глицерин и синтезировать этанол в аэробных условиях, но не росли в анаэробных. Расчет редокс-баланса, показал, что в ходе анаэробного процесса накапливаются восстановленные эквиваленты в виде восстановленных хинонов, которые клетка не может окислить. Если в среду добавить акцептор электронов, например фумарат, рост возобновляется. В качестве такого акцептора можно использовать и электрод (пути прямого электронного транспорта от *S. oniedensis* через Mtr-систему рассмотрены в главе «Внеклеточный транспорт электронов»). Действительно, в присутствии электрода (анода) в анаэробных условиях *S. oniedensis* росла на глицерине и синтезировала этанол и ацетат. При инактивации генов биосинтеза ацетата такая культура в анодной камере превращала 82% глицерина в спирт, производя при этом электричество в количестве 100 кДж/моль глицерина [110].

Генетические манипуляции с электрогенными бактериями находятся на стадии разработки, и представляет интерес успешно осуществленная попытка превратить в электроген такую изученную бактерию, как *E. coli*. В 2015 г. американские исследователи перенесли в *E. coli* гены для белков SumA, HrtC и STC, ответственных за внеклеточный транспорт электронов у *Shewanella oniedensis*. Это усилило электронный транспорт в периплазму на 189% [111]. В присутствии переносчика электронов метиленового синего удалось осуществить перепрограммирование метаболизма *E. coli* от ферментации глицерина к дыханию с помощью электрода [111].

Электроферментация – это область исследований, которая может связать традиционную ферментацию с электрохимией. Электроды, помимо прямой передачи электронов микроорганизмам, могут модифицировать среду, изменяя ее редокс-баланс. Эти изменения могут влиять на состав популяции в смешанных культурах, а также на селективность и выход целевых продуктов [112, 113].

ПЕРСПЕКТИВЫ МИКРОБНОГО ЭЛЕКТРОСИНТЕЗА

Электробиосинтез – очень молодое направление науки с огромным практическим потенциалом. Реализация этого потенциала потребует многочисленных фундаментальных исследований

внеклеточного транспорта электронов, образования и функционирования биопленок на катоде и транспорта протонов, компенсирующих заряды электронов. Необходим поиск новых электрогенов и совершенствование известных. Реконструкция геномов необходима как для активации транспорта электронов, так и для изменения метаболизма бактериальной клетки с целью расширения круга получаемых продуктов. Уже сконструированы бактерии *Clostridium ljungdahlii*, способные синтезировать бутират при росте на углекислом газе [114]. Самая изученная бактерия *E. coli* в результате десятилетних усилий многих исследователей превращена в электроген [115].

Помимо совершенствования микроорганизмов, огромное значение для практической реализации технологии представляют исследования, направленные на совершенствование конструкции электробиореакторов и материала электродов.

Данный обзор ставил цель познакомить читателя с основными достижениями микробного электросинтеза и обратить внимание на потенциальные возможности технологии. В последние годы печатается большое число обзоров, посвященных электробиосинтезу, что указывает на осознание научной общественностью важности этого направления. Заинтересованный читатель может найти в этих обзорах дополнительную информацию [116–123].

ЛИТЕРАТУРА

- Rabaey K., Rozendal R.A. Microbial electro synthesis revisiting the electrical route for microbial production. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 706–716.
- Lovley D.R., Nevin K.P. Electro commodities powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxides with electricity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013, 24, 385–390.
- Rosenbaum M., Henrich A.W. Engineering microbial electrocatalysis for chemical and fuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 29, 93–98.
- Zhang Y., Angelidaki I. Microbial electrolysis cells tuning to be versatile technology: Recent advances and future challenges. *Water Res.* 2014, 56, 11–25.
- Mohan S.V., Velvizh G., Krishna K.V., Babu M. L. Microbial catalyzed electrochemical systems: A biofactory with multi-facet application. *Biores. Technol.*, 2015, 165, 355–364.
- Rozendal R.A., Hamelers H.V.M., Rabaey K., et al. Towards practical implementation of bioelectrochemical waste water treatment. *Trends iBiotechnol.*, 2008, 26, 450–459.
- Logan B.E., Hamelers B., Rozendal R.A., et al. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ Sci. Technol.*, 2006, 40, 5181–5191.
- Debabov V.G. Electricity from microorganisms. *Mikrobiologiya (Microbiology)*. 2008, 77, 149–157.
- Wang H., Park J.D., and Ren Z.J. Practical energy harvesting for microbial fuel cells: a review. *Environ Sci. Technol.*, 2015, 49, 3267–3277.
- Mathuriya A.S., Yakhimi J.V. Microbial fuel cells – application for generation electrical power and beyond. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2016, 42, 127–143.
- Logan B.E. Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Appl. Microbial Biotechnol.* 2010, 85, 1665–1671.
- Li W.W., Sheng G.P. Microbial fuel cells in power generation and extended application. *Adv. Biochem. and Biotechnol.*, 2012, 128, 16–197.
- Park D.H., Guetter M.V., Jain M.K., and Zeikus J.G. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolic production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 66, 2912–2917.
- Aulenta F., Catervi A., Majone M., et al. Electron transfer from a solid-state electrode assisted by methyl viologen sustains efficient microbial reductive dechlorination of TCE. *Sci. Technol.*, 2008, 41, 2554–2559.
- Rabaey K., Boon N., Hufe M and Verstraete W. Microbial phenazine production enhance electron transfer in biofuel cells. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39, 3401–3408.
- Marsil E., Baron D.B., Shikahare I.D., Coursele J.A., et al. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2008, 105, 3968–3973.
- Sydow A., Krieg T., Mayer F., et al. Electroactive bacteria – molecular mechanisms and genetic tools. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 2014, 98, 8481–8495.
- Meyer T.E. Tsapin A.I., Vandenberghe I., et al. Identification 42 possible cytochrome C genes in the *Shewanella oniedensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. *OMICS*. 2004, 8, 57–77.
- Methe B., Nelson K.E., Eisen J., et al. Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science*, 2003, 302, 1967–1969.
- Bücking C., Schicklberger M., and Gescher J. The biochemistry of dissimilatory ferric iron and manganese reduction in *Shewanella oniedensis*. [Eds A. Kappler, J. Gescher]. Microbial metal respiration. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag. 2013, 49–82.
- Levar C., Rollefson J., and Bond D. Energetic and molecular constraints of the mechanism of environmental Fe (III) reduction by *Geobacter*. [Eds J. Beshar, A. Kappler]. Microbial metal respiration. Berlin-Heidelberg: Springer. 2013, 29–48.
- Coursele D., Gralnick J.A. Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oniedensis* strain MR-1. *Mol. Microbiol.* 2010, 77, 995–1008.
- Ross D.E., Flynn J.M., Baron D.B., et al. Towards electrosynthesis in *Shewanella*: Energetics of reversing the Mtr pathway for reductive metabolism. *PlosOne*. 2011, 6(2), e16649.
- Strychar S.M., Glaven R.M., Coop M.V., et al. Gene expression and deletion analysis of mechanisms for electron transfer

- from electrodes to *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry*, 2011, 80, 142–150.
25. Requera G., Mc Carthy K.D., Mehta T., et al. Extra cellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 2005, 435, 1098–1101.
 26. Gorby Y.A., Yanina S., Mc Lean J.S., et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 2006, 103, 11358–11363.
 27. Dohnalkova A.C., Marshall M.J., Arey B.W., et al. Imaging hydrated microbial extra cellular polymers: comparative analysis by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 1254–1262.
 28. Pirbadin S., Barchinger S.E., Leung K.M., et al. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are out membrane and periplasmic extension of the extra cellular electron transport components. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 2014, 111, 12883–12888.
 29. Polizzi N.F., Skourtis S.S., Beratan D.N. Physical constraints one charge transport through bacterial nanowires. *Faraday Discuss.*, 2012, 155, 43–61.
 30. Malvankar N.S., Vargas M., Nevin K.P., et al. Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nat. Nanotechnol.*, 2011, 6, 573–579.
 31. Vargas M., Malvankar N.S., Tremblay P.L., et al. Aromatic amino acids required for pile conductivity and long-range extra cellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*. *MBio*, 2013, 4, e00105-13.
 32. Malvankar N.S., Vargas M., Nevin K.P., et al. Structural basis for metallic-like conductivity in microbial nanowires. *MBio*, 2016, 6(2), e00084.
 33. Malvankar N.S., Lovley D.R. Microbial nanowires for bioenergy application. *Current Opin. Biotechnology*, 2014, 27, 88–95.
 34. Kato S. Biotechnological aspects of microbial extra cellular electron transfer. *Microbes Environ*, 2015, 30, 133–139.
 35. Kracke F., Vassilev I., Krömer J. Microbial electron transport and energy conservation – the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Frontiers Microbiology*, 2015, 6, 575–584.
 36. Zhi W., Ge Z., He Z., and Zhang H. Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: a review. *Bioresour. Technol.*, 2014, 171, 461–468.
 37. Rosenbaum M., Auleneta F., Villano M., and Angenent L.T. Cathodes as electron donors for microbial metabolisms: which extra cellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour. Technol.*, 2011, 102, 324–333.
 38. Fricke K., Harnisch E., Schroder U. On the use of cyclic voltammetry for the study of electron transfer in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.*, 2008, 1, 144–147.
 39. Marsili E., Rollefson J.B., Baron D.B., et al. Microbial biofilm voltametry: direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74, 7329–7337.
 40. Babauta J., Renslow R., Lewandowski Z., Begenal H. Electrochemically active biofilms: facts and fiction. *Biotechnol. Advances*, 2012, 28, 789–812.
 41. Lin Y., Bond D.R. Long-distance electron transfer by *Geobacter sulfurreducens* biofilms results in accumulation of reduced c-type cytochromes. *Chem. Sus. Chem.*, 2012, 5, 1047–1053.
 42. Jana P.S., Katari K., Kavangh P., et al. Charge transport in films of *Geobacter sulfurreducens* on graphite electrodes as a function of the film thickness. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, 16, 9039–9046.
 43. Korth B., Rosa L.F.M., Harnisch F., and Picioroann C. A framework for modeling electro active microbial biofilms performing direct electron transfer. *Bioelectrochemistry*, 2015, 106(PtA), 194–206.
 44. Erable B., Duteanu N.M., Ghangrekar M.M., et al. Application of electro active biofilms. *Biofouling*, 2010, 26, 57–71.
 45. Kalathil S., Khan M.M., Lee J., and Cho M.H. Production of bioelectricity, bio-hydrogen, high value chemicals and bioinspired nanomaterials by electrochemically active biofilms. *Biotechnol. Advances*, 2013, 31, 915–924.
 46. Bičaková O., Straka P. Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. *Int. J. Hydrogen Energy.*, 2012, 37, 11563–11578.
 47. Ditzig J., Lin H., Logan B.E. Production of hydrogen from domestic wastewater using a bioelectrochemically assisted microbial reactor (BEAMR). *Int. J. Hydrogen Energy*, 2007, 32, 2296–2304.
 48. Esswain A.S., Surendranath Y., Reece S.Y., and Nocera D.G. Highly active cobalt phosphate and borate based oxygen evolving anodes operating in neutral and natural water. *Energy Environ. Sci.*, 2011, 4, 499–504.
 49. Wrana N., Sparling R., Cicek N., and Levin D.B. Hydrogen gas production in microbial electrolysis cell by electrogenesis. *J. Cleaner Production*, 2011, 18, 105–111.
 50. Lee M.Y., Kim K.Y., Yang E., and Kim I.S. Evolution of hydrogen production and internal resistance in forward osmosis membrane integrated microbial electrolysis cells. *Bioresour. Technol.*, 2015, 187, 106–112.
 51. Call D., Logan B.E. Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42, 3401–3406.
 52. Hu H., Fan Y., and Lin H. Hydrogen production in a single chamber tubular microbial electrolysis cells using non-precious metal catalysis. *Int. J. Hydrogen Energy.*, 2009, 34, 8535–8542.
 53. Rozendal R.A., Yermiasse A.W., Hamelers H.V., and Buisman C.J. Hydrogen production with a microbial biocathode. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42, 629–634.
 54. Geelhoed J.S., Hamelers H.V.M., and Stams A.J.M. Electricity-mediated biological hydrogen production. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2010, 13, 307–315.
 55. Croese E., Pereira M.A., Envezink G-J.W., et al. Analysis of the microbial community of the biocathode of hydrogen-producing microbial electrolysis cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 92, 1083–1093.
 56. Fu O., Kabayashi H., Kuramochi Y., et al. Bioelectrochemical analysis of the a thermophilic biocathode catalyzing sustainable hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2013, 38, 15638–16645.

57. Aulenta F., Catapono L., Snip L., et al. Linking bacterial metabolism to graphite cathodes; electrochemical insights into the H₂-producing capability of *Desulfovibrio* sp. *Chem. Sus. Chem.*, 2012, 5, 1081–1085.
58. Chae K.J., Choi M.-J., Kim K.Y., et al. A solar-powered microbial electrolysis cell with a platinum catalyst free cathode to produce hydrogen. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43, 5230–5239.
59. Sun M., Sheng G.-P., Zhang L., et al. The MEC-MFC-coupled system for biohydrogen production from acetate. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42, 8095–8100.
60. Wang A., Sun D., Cao G., et al. Integrated hydrogen production process from cellulose by combining dark fermentation, microbial fuel cells, and microbial electrolysis cell. *Bioresour. Technol.*, 2011, 102, 4137–4143.
61. Borole A.P. Microbial fuel cells and microbial electrolyses. http://www.electrochem.org/dl/interface/...fall15_p55_59p.
62. Wang H., Luo H., Fallgren P.H., et al. Bioelectrochemical system platform for sustainable environment remediation and energy generation. *Biotechnology Advances*, 2015, 33, 317–334.
63. Bowien B., Kusian B. Genetics and control CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.*, 2002, 178, 85–93.
64. Pohlmann A., Fricke W.F., Reinecke F., et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha H-16*. *Nat. Biotechnol.*, 2007, 25, 478–484.
65. Yu J., Dow A., Pingalis S. The energy efficiency of carbon dioxide fixation by a hydrogen-oxidizing bacterium. *Int. J. Hydrogen Energy.*, 2013, 38, 8683–8690.
66. Green M.A., Emery K., Hishikawa Y., et al. Solar efficiency tables (version 45). *Prog. Photovolt. Res. Appl.*, 2014, 23, 1–9.
67. MacDonald M. *Photobiology of higher plants*. N.Y.: Wiley, 2003.
68. Grousseau E., Lu J., Corret N., et al. Isopropanol production with engineering *Cupriavidus necator* as bioproduction platform. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98, 4277–4290.
69. Torella J.P., Gagliardi C.J., Chen Y.S., et al. Efficient solar to fuels production from a hybrid microbial-water-splitting catalysis system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 2015, 112, 2337–2342.
70. Khan N.E., Meyers J.A., Tuerk A.L., and Curtis W.R. A process economic assessment of hydrocarbon biofuel production using chemoautotrophic organisms. *Bioresour. Technol.*, 2014, 172, 201–211.
71. Matassa S., Boon N., and Verstraete W. Resource recovery from used water: The manufacturing ability of hydrogen-oxidizing bacteria. *Water Res.*, 2015, 68, 467–478.
72. Yishai O., Lindner S.N., Gonzalez de La Cruz., et al. The formate bio-economy. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2016, 35, 1–9.
73. Bar-Even A., Noor E., Flamholz A., and Milo R. Design and analysis of metabolic pathways supporting chemotrophic growth for electricity-dependent cultivation of microbes. *Biochimic. Biophysic Acta.*, 2012, 1827(8-9), 1039–1047.
74. Ленгелер И., Древа Г., Шлегель Г. Современная микробиология. М.: Мир, 2005, 1, 358–363.
75. Cheng S., Xing D., Call D.E., and Logan B.E. Direct biological conversion of electrical current into methane by electro-methanogenesis. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43, 3953–3958.
76. Villano M., Monaco G., Aulenta F., and Majone M. Electrochemically assisted methane production in a biofilm reactor. *J. Power Sources*, 2011, 196, 9467–9472.
77. Beese-Vasbender P.F., Crote J.-P., Garrelfs J., et al. Selective microbial electrosynthesis of methane by a pure culture of a marine lithoautotrophic archaeon. *Bioelectrochemistry*, 2015, 102, 50–55.
78. Fu Q., Kuramochi Y., Fukushima N., et al. Bioelectrochemical analysis of the development of thermophilic biocathode catalyzing electromethanogenesis. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, 49, 1225–1232.
79. Ding A., Yang Yu, Sun G., Wu D. Impact of applied voltage on methanogenesis and microbial activities in an anaerobic microbial electrolysis cell (MEC). *Chem. Engineering J.*, 2016, 283, 260–265.
80. Lohner S.T., Dentzmann J.S., and Logan B.E. Hydrogenase-independent take up and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *The ISME J. (The International Society for Microbial Ecology Journal)*, 2014, 8, 1673–1681.
81. Summers Z.M., Fogarty H.E., Leang C., et al. Direct exchange of the electrons with in aggregates an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science*, 2010, 330, 1413–1415.
82. Rotaru A-B, Shrestha P.M., Lin F., et al. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for reduction of carbon dioxide to methane. *Energy Environ. Sci.*, 2014, 7, 408–415.
83. Rotaru A-B, Shrestha P.M., Lin F., et al. Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, 80, 4599–4605.
84. Steigert M., Yates M.D., Call D.F., et al. Comparison of nonprecious metal cathode materials for methane production by electro-methanogenesis. *ACS Sustain Chem. Eng.*, 2014, 7, 910–917.
85. Moreno R., San-Martin M.I., Escapa A., and Morau A. Domestic wastewater treatment in parallel methane production in microbial electrolysis cell. *Renewable Energy*, 2016, 93, 442–448.
86. Zuen G., Kobayashi T., Lu X., and Xu K. Understanding methane bio electro synthesis from carbon dioxide in two-chamber microbial electrolysis cells (MES) containing a carbon biocathode. *Bioresour. Technol.*, 2015, 186, 141–148.
87. Nevin K.P., Woodard T.L., Franks A.E., et al. Microbial electro synthesis: feeding microbes electricity. To convert carbon dioxide and water to multicarbon extra cellular organic compounds. *mBio* 2010, 1(2), e00103-10.
88. Nevin K.P., Hensley S.A., Franks A.E., et al. Electro synthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by diversity of acetogenic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 2882–2886.
89. Ragsdale S.W., Pierce E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochem. Biophys. Acta.*, 2008, 1784, 1873–1898.

90. Drake H.C., Gossner A.S., and Daniel S.L. Old acetogenes new light. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2008, 1125, 100–108.
91. Schuchmann K., Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenes bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, 12, 809–821.
92. Ammam F., Tremblay P-L., Lizak D.M., and Zhang T. Effect of tungstate on acetate and ethanol production by the electro-synthetic bacterium *Sporomussa ovata*. *Biotechnol. Biofuel.*, 2016, 9, 163–173.
93. Tremblay P-L., Huglund D., Koza A., et al. Adaptation of the autotrophic acetogen *Sporomussa ovata* to methanol accelerates the conversion of CO₂ to organic products. *Scientific Reports*. 2015, 5, 1616–16178.
94. Modestra J.A., Navaneeth B., and Mohan S.V. Bio electrocatalytic reduction of CO₂: enrichment of homo acetogenes and pH optimization towards enhancement of carboxylic acids. *J. CO₂ Utilization*, 2015, 10, 78–87.
95. Patil S.A., Arends J.B., Van Wontergem I., et al. Selective Enrichment establishes a stable performing community for microbial electro synthesis of acetate from CO₂. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, 49, 8833–8843.
96. Yordin L., Gringer T., Monett J., et al. High acetic acid rate obtained by microbial electro synthesis from carbon dioxide. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 13566–13574.
97. Hou J., Lin Z., Yang S., and Zhou Y. Three-dimensional macro porous anodes based on stainless steel felt for high-performance microbial fuel cells. *J. Power Sources.*, 2014, 258, 204–209.
98. Guo K., Donose B.C., Soeriyadi A.H., et al. Flame oxidation of stainless steel felt enhances anodic biofilm formation and current output in bioelectrochemical systems. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 7151–7156.
99. Pons L., Delia M.L., and Bergel A. Effect of surface roughness biofilms coverage and biofilm structure on the electrochemical efficiency of microbial cathode. *Bioresource Technol.*, 2011, 102, 2678–2683.
100. Jordin L., Freguia S., Donose B.C., et al. A novel carbon nanotube modified scaffolds an efficient biocathode material for improved microbial electrosynthesis. *J. Mater. Chem.*, 2014, 2, 13093–13102.
101. Zhang T., Nic H.R., Bain T.S., et al. Improved cathode materials for microbial electro synthesis. *Energy Environ. Sci.*, 2013, 6, 217–224.
102. Guo X., Prevot A., Patil S.A., and Rabaey K. Engineered electrodes for microbial electro catalysis. *Curr. Opin. Biotechnology*, 2015, 33, 149–156.
103. Giddings C.G., Nevin K.P., Woodward T., et al. Simplifying microbial electrosynthesis reactor design. *Frontiers Microbiology*, 2015, 6, 1–6.
104. Kreg T., Sydow A., Schröder U., et al. Reactor concepts for bioelectrochemical synthesis and energy conservation. *Trends Biotechnol.*, 2014, 32, 645–655.
105. Hongo M., Jwahara M. Application of electro-energizing method to L-glutamic acid fermentation. *Agric. Biol. Chem.*, 1979, 43, 2075–2083.
106. Hongo M. and Jwahara M. Determination of electro-energizing conditions for L-glutamic acid fermentation. *Agric. Biol. Chem.*, 1979, 43, 2083–2086.
107. Sasaki K., Tsuge Y., Sasaki D., and Kondo A. Increase in lactate yield by growing *Corynebacterium glutamicum* in a bioelectrochemical reactor. *J. Biosci. Bioengineering*, 2014, 117, 598–601.
108. Zhao Y., Cao W., Wang Z., et al. Enhanced succinic acid production from corn cob hydrolyzates by microbial electrolysis cells. *Bioresource Technol.*, 2016, 202, 152–157.
109. Kim T.S., and Kim B.H. Electron flow shift in *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically introduced reducing equivalent. *Biotechnol. Lett.*, 1988, 10, 123–128.
110. Flynn J.M., Ross D.E., Hunt K.A., et al. Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode-interfaced bacteria. *mBio*, 2010, 1(5), e00190-10.
111. Sturm-Richter K., Golitsch F., Sturm G., et al. Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresource Technol.*, 2015, 186, 89–96.
112. Schievano A., Sciarria P., Van Broekhoven K., et al. Electro-fermentation—merging electrochemistry with fermentation in industrial application. *Trends Biotechnol.*, 2016, 34, 866–878.
113. Moscoviz R., Toledo-Alarcon J., Trably E., and Bernet N. Electro-fermentation: how to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends Biotechnol.*, 2016, 34, 856–865.
114. Ganique R., Puig S., Batle-Vilanova P., et al. Microbial electro synthesis of butyrate from carbon dioxide. *Chem. Commun.*, 2015, 51(15), 3235–3238.
115. Ter Avest M.A., Zajdel T.J., and Ajo-Franklin C.M. The Mtr pathway of *Shewanella oniedensis MR-1* couples substrate utilization to current production in *Escherichia coli*. *Chem. Electro. Chem.*, 2014, 1(11), 1874–1879.
116. Rabaey K., Girgnis P., and Nielsen L. Metabolic and practical consideration on microbial electro synthesis. *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2011, 22, 371–377.
117. Wang H., Ren Z.J. A comprehensive review of microbial electrochemical system as a platform technology. *Biotechnol. Adv.*, 2013, 31, 1796–1807.
118. Wang H., Qian F., and Li Y. Solar-assisted microbial fuel cells for bioelectricity and chemical fuel generation. *Nano Energy.*, 2014, 8, 264–273.
119. Torres C.I. On the importance of identifying, characterizing, and predicting fundamental phenomena towards microbial electrochemistry application. *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2014, 27, 107–114.
120. Hallenbeck P.C., Grogger M., and Veverka D. Recent advances in microbial electrocatalysis. *Electrocatalysis*. 2014, 5, 319–329.
121. Patil S.A., Gildemyn S., Pant D., et al. A logical data representation framework for electricity-driven bioproduction process. *Biotechnology Adv.*, 2015, 33(6), 736–744.

122. Nybo S.E., Khan N.E., Woolston B.M., and Curtis W.R. Metabolic engineering in chemolithoautotrophic hosts for the production of fuels and chemicals. *Metab. Eng.*, 2015, 30, 105.
123. El Mekawy A., Hegab H.M., Mohanakzishna G., et al. Technological advances in CO₂ conversion electro-biorefinery: A step toward commercialization. *Bioresour. Technol.*, 2016, 34, 357–370.

Microbial Electrosynthesis

V.G. DEBABOV

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIGenetika), Moscow, 117545 Russia

e-mail: debabov@genetika.ru

Received December 07, 2016

Abstract – Electrobiosynthesis carried out using microorganisms is a novel technique with a huge potential. In this review, the mechanisms of the direct electron transfer from cathode to bacterial cells are regarded, along with a row of anaerobic processes that are catalyzed during this transfer, namely biosynthesis of hydrogen, methane and multicarbon compounds. The possibilities of using electrolysis-generated hydrogen for the hydrogen-oxidizing bacteria growth and also innumerable examples of the effect of electricity on redox processes during the fermentation are discussed. The electrobiosynthesis potential will only be realized after deep basic investigations of the mechanisms of electron extracellular transfer, and coupling of electric and metabolic processes. The works on the rearrangement of microbial genomes in order to intensify their metabolism and broaden the repertoire of synthesized metabolites will be required. The technological progress will depend on not only improvement of microorganisms, but also on successful construction of biocompatible electrodes and design of high-productive reactors.

Key words: microbial electrosynthesis of hydrogen, methane, acetic acid; acetogens; extracellular transport of electrons; electrofermentation.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-9-28