

УДК 579.6

## СОПРЯЖЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРОДА (ОБЗОР)

© 2012 г. Д. Н. Текучева, А. А. Цыганков

Институт фундаментальных проблем биологии РАН

e-mail: tekuchevadn@rambler.ru; ttt-00@mail.ru

Поступил в редакцию 29.06.2011 г.

Описаны возможные пути совмещения различных биологических процессов получения биоводорода. Некоторые из них интенсивно исследуются в настоящее время, другие — теоретически возможны, но пока не изучены. Особое внимание уделено факторам, влияющим на эффективность сопряженных систем.

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРОДА И ПУТИ ИХ ИНТЕГРАЦИИ

Способность микроорганизмов синтезировать водород интересна не только как метаболический феномен, но и потому, что водород является перспективным энергоносителем. Он характеризуется высокой теплотой сгорания, а при сжигании водорода образуется в основном вода. Кроме того, водород может непосредственно использоваться в топливных элементах. Поэтому разработка методов экологически чистого синтеза водорода может обеспечить человечество дешевым и экологически безопасным энергоносителем.

Молекулярный водород присутствует в метаболических путях многих микроорганизмов. Часто один микроорганизм способен выделять или поглощать  $H_2$  с участием нескольких метаболических путей. Для каждого биологического процесса выделения водорода характерны свои первичные источники энергии и ключевые ферменты.

Темновые гетеротрофные процессы обладают большими скоростями образования  $H_2$  [1], не требуют больших площадей для размещения реакторов в сравнении со светозависимыми процессами. В ходе светозависимых процессов, в свою очередь, субстраты преобразуются в водород с большей эффективностью.

В процессах выделения водорода, не требующих присутствия света (темновые), используется энергия органических субстратов [2]. Наиболее широко изучается темновое брожение с выделением водорода за счет фермента гидрогеназы (1А, табл. 1). При этом наибольшая объемная скорость выделения водорода была получена с использованием гранулированной биомассы и достигала 15 л/л реактора в 1 ч при росте на глюкозе [3]. Это значение уже близко к расчетным практически значимым величинам [4, 5]. Эффективность процесса низка (теоретически из 1 моля гексозы можно получить 12 молей  $H_2$ , тогда как при брожении мак-

симальное теоретическое значение выхода  $H_2$  — 4 моля).

Смешанное брожение с выделением водорода за счет формиатгидрогеназной системы осуществляют бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (1Б, табл. 1). Эти бактерии — факультативные анаэробы, поэтому при наличии кислорода культуры остаются жизнеспособными, что важно при практическом применении. Однако максимально возможный выход водорода составляет всего 2 моль/моль гексозы [23]. Важным преимуществом получения водорода двумя вышеописанными методами является возможность использования широкого круга органических отходов.

Нитрогеназа — ключевой фермент фиксации азота, побочной реакцией которого является выделение водорода. Вполне вероятно, что представители рода *Clostridia* при недостатке азота в анаэробных условиях имели бы достаточно высокие скорости выделения водорода за счет действия нитрогеназы (2, табл. 1). Однако этот процесс обычно сопутствует брожению с выделением водорода, и их трудно разделить.

Некоторые пурпурные бактерии способны использовать  $CO$  в качестве единственного источника углерода при росте в темноте без доступа кислорода [24]. При этом окисление угарного газа идет с одновременным восстановлением протонов до водорода, катализируемым гидрогеназой (3, табл. 1) [7]. Такой процесс, вероятно, имеет практическое применение для очистки от  $CO$  газа, полученного конверсией природного газа и называемого синтезгазом. Очищенный от каталитического яда водород может подаваться в топливные элементы. Однако существуют только единичные опубликованные работы на эту тему.

Весьма привлекательным является недавно показанный, но в настоящий момент малоизученный, процесс преобразования органики с приложением внешнего электрического тока в

**Таблица 1.** Преимущества и недостатки различных метаболических путей получения водорода в связи с их практическим применением

Метаболический путь и ключевой фермент синтеза водорода	Преимущества	Недостатки	Микроорганизмы, ссылка
Темновые процессы получения водорода			
1 А. Брожение; гидрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Широкий спектр используемых субстратов.</li> <li>• Возможность применения органических отходов.</li> <li>• Возможность использования микробных сообществ вместо чистых культур.</li> <li>• Высокие скорости выделения водорода.</li> <li>• Хорошая изученность процесса.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Относительно низкий теоретически возможный выход водорода (4 моль/моль гексозы).</li> <li>• Присутствие органических продуктов брожения (кислоты, спирты) делает очистку отходов неполной.</li> <li>• Высокое парциальное давление водорода ингибирует процесс.</li> <li>• Необходимость предотвращения метаногенеза.</li> <li>• Наличие водородпоглощающих организмов в сообществе приводит к снижению эффективности процесса.</li> </ul>	Многие гетеротрофные анаэробы (роды клостридии, энтеробактерии, термофильные археи, некоторые пурпурные бактерии)[2].
Б. Брожение с образованием формиата и его дальнейшим разложением: $\text{НСООН} \rightarrow \text{H}_2 + \text{СО}_2$ . Формиатгидрогеназный комплекс	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Факультативные анаэробы.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкий теоретический и практический выходы водорода (2 моль <math>\text{H}_2</math>/моль гексозы).</li> </ul>	Enterobacteriaceae [6]
2 Брожение или дыхание совместно с фиксацией азота; нитрогеназа	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Все органические субстраты могут аэробно или анаэробно разлагаться в условиях фиксации азота.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Те же, что в процессе 1.</li> </ul>	Все хемотрофные бактерии, способные к азотфиксации.
3 Анаэробное окисление СО как источника углерода; СО-толерантная гидрогеназа совместно с СО-дегидрогеназой.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Субстратом является токсичный газ — компонент синтезгаза.</li> <li>• Возможная очистка водорода от СО перед подачей в топливные элементы.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокая чувствительность к кислороду.</li> <li>• Присутствие органических субстратов и водорода ингибируют процесс.</li> </ul>	Бактерии разных систематических групп (некоторые грамотрицательные ( <i>Rhodospirillum rubrum</i> , <i>Rubrivax gelatinosus</i> ) [7] и грамположительные ( <i>Carboxydotherrmus hydrogeniformans</i> ) бактерии, археи ( <i>Methanosarcina barkeri</i> ) [8].
4 Микробные топливные элементы (см. описание в тексте, рис. 3).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Единственный способ получения водорода из органических соединений с приложением электрической энергии.</li> <li>• Возможно применение для очистки сточных вод с низким содержанием органики.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Необходимо использовать катализатор на аноде для получения <math>\text{H}_2</math>.</li> <li>• Наличие водородпоглощающих организмов в анодном пространстве приводит к снижению эффективности процесса.</li> </ul>	Показано при использовании анаэробных гетеротрофных сообществ [9] или <i>Geobacter sulfurreducens</i> [9], <i>Shewanella oneidensis</i> [10] живущих в МТЭ.

Таблица 1. Окончание

	Метаболический путь и ключевой фермент синтеза водорода	Преимущества	Недостатки	Микроорганизмы, ссылка
Светозависимые процессы получения водорода				
5	Аноксигенный фотосинтез в условиях лимитирования азотом; нитрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокие скорости выделения водорода (особенно у пурпурных несерных бактерий).</li> <li>• В процессе может использоваться свет ближней инфракрасной области.</li> <li>• Низкая чувствительность к парциальному давлению <math>H_2</math>.</li> <li>• Высокий теоретически возможный выход водорода (12 моль <math>H_2</math>/моль гексозы).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Чувствительность к присутствию связанного азота (инактивация и репрессия синтеза нитрогеназы).</li> <li>• Чувствительность нитрогеназы к кислороду.</li> <li>• Узкий спектр используемых субстратов, (не способны использовать органические полимеры).</li> <li>• Низкая эффективность (потребность в электронах и АТФ).</li> </ul>	Азотфиксирующие аноксигенные фотосинтетики [11] (серные и несерные пурпурные бактерии, зеленые бактерии).
6	Аноксигенный фотосинтез в перевосстановленных условиях; обратимая гидрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Относительно высокая эффективность процесса (нет потребности в АТФ).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Процесс возможен только кратковременно при перевосстановленности электрон-транспортной цепи (на данном уровне исследований).</li> <li>• Высокое парциальное давление водорода ингибирует процесс.</li> </ul>	Аноксигенные фотосинтетики [12, 13] или цианобактерии [14] в анаэробных условиях, обладающие обратимой гидрогеназой ( <i>hox YH</i> ).
7	Оксигенный фотосинтез; нитрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Преобразует энергию света в водород в стехиометрии, близкой к реакции разложения воды: <math>2H_2O \leftrightarrow 2H_2 + O_2</math>.</li> <li>• Низкая чувствительность к парциальному давлению <math>H_2</math>.</li> <li>• Естественное временное или пространственное разобщение синтеза <math>O_2</math> и <math>H_2</math>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкие скорости выделения водорода.</li> <li>• Низкая эффективность (потребность в электронах и АТФ).</li> </ul>	Азотфиксирующие цианобактерии: синхронные культуры одноклеточных цианобактерий (временное разделение) [15, 16], гетероцистные цианобактерии (пространственное разделение) [17].
8	Оксигенный фотосинтез; гидрогеназа	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Преобразование энергии света в водород в стехиометрии, близкой к реакции разложения воды: <math>2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2</math>.</li> <li>• Высокая эффективность процесса.</li> <li>• Высокие скорости выделения водорода.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Процесс возможен только кратковременно в начале освещения культуры после анаэробного роста (инкубации) в темноте.</li> </ul>	Микроводоросли, содержащие гидрогеназу [18].
9	Временное разделение кислородного фотосинтеза и светозависимого выделения водорода в условиях недостатка серы; гидрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Преобразование энергии света в водород.</li> <li>• Длительный, стабильный процесс.</li> <li>• Возможность одну культуру повторно вводить в цикл "оксигенный фотосинтез с запасанием крахмала — светозависимое выделение водорода".</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкие скорости выделения водорода.</li> <li>• Высокая чувствительность к кислороду.</li> <li>• Присутствие органических продуктов реакции — органические кислоты (в основном ацетат), этанол →.</li> <li>• До сих пор не ясна эффективность процесса.</li> </ul>	Микроводоросли, содержащие гидрогеназу [19].
10	Временное разделение кислородного фотосинтеза с накоплением запасных полисахаридов и последующее их сбраживание с выделением $H_2$ ; гидрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Преобразование энергии света в водород.</li> <li>• Возможно повторение цикла "оксигенный фотосинтез — брожение".</li> <li>• Длительный, стабильный процесс.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкие скорости выделения водорода.</li> <li>• Инактивация кислородом.</li> <li>• Присутствие органических продуктов реакции — органические кислоты (в основном ацетат), этанол.</li> </ul>	Цианобактерии с обратимой гидрогеназой ( <i>hoxYH</i> ) [20, 21] и морские микроводоросли [22].

водород в микробных топливных элементах (МТЭ) [25] (4, табл. 1). В качестве микробных агентов применяются как чистые культуры (*Geobacter*, *Shewanella*), так и микробные сообщества. Наличие водородпоглощающих микроорганизмов, в частности метанобразующих бактерий, в анодном пространстве снижало эффективность системы [9].

Среди светозависимых процессов получения водорода с наибольшими скоростями протекает фотоферментация, осуществляемая пурпурными несерными бактериями посредством нитрогеназы в условиях лимитирования азотом (5, табл. 1). Термин “фотоферментация” требует некоторого пояснения. В последние годы в зарубежной литературе этот термин (photofermentation) появился при описании светозависимого выделения водорода пурпурными бактериями при недостатке азота за счет действия нитрогеназы. Несмотря на то, что этот процесс не имеет ничего общего с брожением, возможность использования одного термина кажется привлекательной, и мы будем его использовать для обозначения указанного процесса. Для пурпурных и зеленых серных бактерий характерны менее высокие скорости выделения водорода. Недостатком такого метаболического пути является использование узкого спектра органических доноров электронов [11].

Выделение водорода в условиях избытка восстановителя на свету за счет действия обратимой гидрогеназы — процесс, описанный несколько лет назад для цианобактерии *Synechocystis* sp. [14] и пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS [12, 13] (6, табл. 1). Несмотря на то, что скорости выделения водорода и другие практически значимые параметры до сих пор не изучены, путь, в котором сложный и АТФ-затратный фермент нитрогеназа заменен гидрогеназой, может оказаться в центре исследовательского внимания.

Цианобактерии, образующие гетероцисты, способны к выделению водорода посредством нитрогеназы при окисненном фотосинтезе (7, табл. 1). Одновременное проведение строго анаэробного процесса (функционирование нитрогеназы) и фотосинтеза с выделением кислорода в данных бактериях оказалось возможным благодаря их пространственному разделению. Окислительный фотосинтез проходит в вегетативных клетках, а нитрогеназа локализована в гетероцистах. Стехиометрическое соотношение образуемых  $H_2$  и  $O_2$  в определенных условиях близко к реакции биофотоллиза воды [26].

Одноклеточные цианобактерии также способны к азотфиксации (и следовательно, к ее побочной реакции — образованию водорода) за счет аэробного фотосинтеза (7, табл. 1). Однако анаэробноз, необходимый для нитрогеназы, достигается за счет временного разобщения фотосинтеза и азотфиксации посредством циклического осве-

щения в синхронных культурах [26]. Многие физиологические характеристики, следовательно, и перспективы применения данного биологического процесса пока не ясны, но синхронные культуры *Synechococcus* при определенных условиях показывают высокие скорости выделения водорода [15, 16].

Микроводоросли, адаптированные к темноте, способны выделять водород в ответ на освещение [27] (9, табл. 1). Такой биофотоллиз воды возможен только кратковременно, пока накапливающийся кислород не инактивирует гидрогеназу, что приводит к прекращению выделения водорода. Этот процесс имеет высокую эффективность преобразования солнечной энергии [28].

Устойчивое выделение водорода *Chlamydomonas reinhardtii* было зарегистрировано в культуре, использующей ацетат, при недостатке серы. Сначала это явление было показано для фотогетеротрофных [29], позднее и для фотоавтотрофных культур [30].

Цианобактерии и микроводоросли способны синтезировать АТФ в ходе брожения из накопленных при фотосинтезе углеводов. В процессе брожения при определенных условиях микроводоросли, наряду с ацетатом и другими минорными продуктами, образуют водород [20–22]. Таким образом, в одной клетке совмещаются процессы накопления полисахаридов за счет энергии света и их сбраживания с выделением  $H_2$  (10, табл. 1).

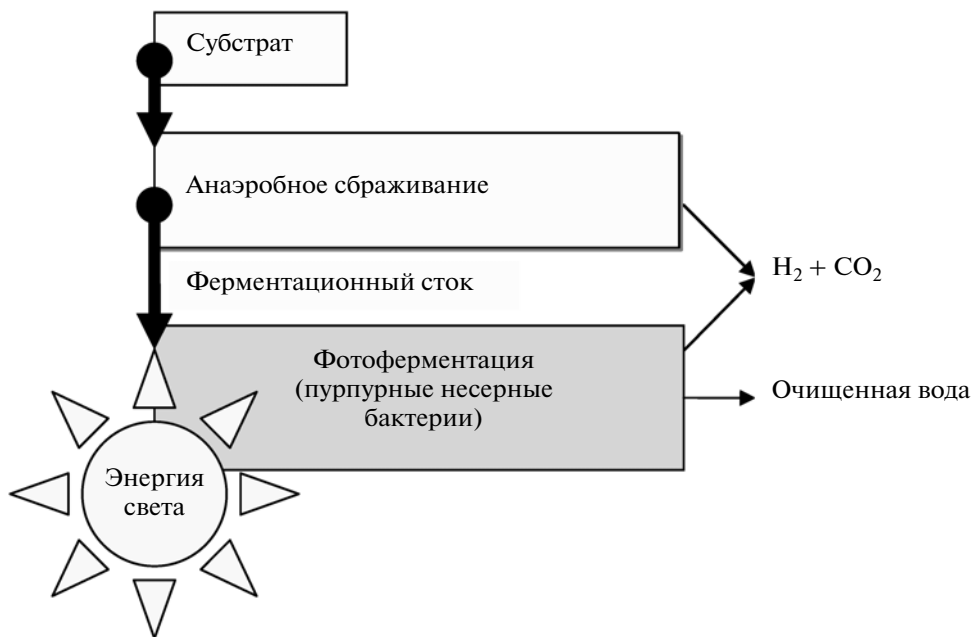
Краткий обзор известных биологических способов получения водорода показывает, что в каждом процессе наряду с практически значимыми преимуществами есть и недостатки. Однако, интегрируя описанные процессы в одну систему, можно преодолеть некоторые из них. В данном обзоре дается рассмотрение и оценка существующих схем интеграции биологических процессов получения водорода для их возможного применения в практике.

Совмещение двух биологических процессов подразумевает, что побочные продукты одной стадии будут субстратами для организмов, осуществляющих вторую, при этом повышается эффективность использования источника энергии (органические соединения или свет).

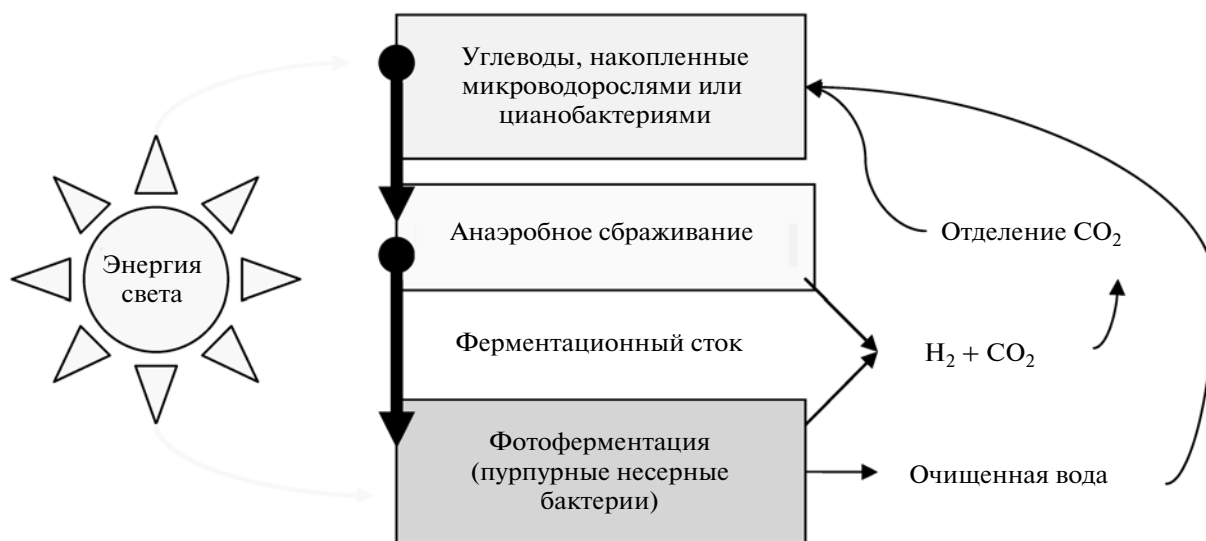
Возможные пути интеграции для получения водорода (и электрического тока).

1. Совмещение получения водорода за счет брожения с образованием органических кислот (1, табл. 1) и их дальнейшее преобразование в водород аноксигенными фотосинтетиками на свету в условиях недостатка азота (5, табл. 1) (рис. 1).

2. Субстратом для двухстадийной системы с участием анаэробных гетеротрофных бактерий (1, табл. 1) и аноксигенных фотосинтетиков (5, табл. 1, рис. 2) может быть биомасса микроводорослей вместо органических отходов. Таким образом, добавляется дополнительный этап в схему



**Рис. 1.** Схема получения водорода в интегрированной системе за счет сбраживания органики и фотоферментации (схема интеграции № 1).



**Рис. 2.** Схема совмещения накопления биомассы микроводорослями и ее двухстадийного разложения по схеме № 1 (схема интеграции № 2).

совмещения, изображенную на рис. 1, при этом система становится замкнутой по углероду.

3. Совмещение сбраживания органических субстратов (1, табл. 1) с получением водорода и ацетата анаэробными гетеротрофными бактериями и МТЭ (4, табл. 1), которые дают возможность

получать водород из простой органики (такой, как ацетат) с применением электрического тока (рис. 3).

4. Объединение временно разобщенного оксигенного фотосинтеза и темнового сбраживания накопленного крахмала с выделением водорода в

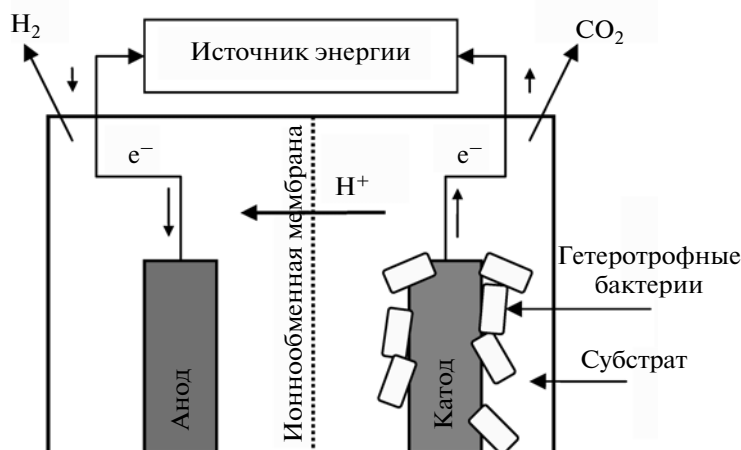


Рис. 3. Микробный топливный элемент (МТЭ).

одном организме (10, табл. 1) и фотогетеротрофное выделение водорода из образовавшихся органических кислот (5, табл. 1). Такой путь интеграции можно модифицировать, применив на первой стадии метод лимитирования микроводорослей серой (9, табл. 1).

5. Совмещение оксигенного фотосинтеза (7–10, табл. 1) и фотогетеротрофного выделения водорода при лимитировании по азоту (5, табл. 1). В основе такой схемы лежит использование разности в спектрах поглощения микроводорослей и пурпурных бактерий. При совмещении процессов в одном пространстве повышается эффективность поглощения света и сокращается место для размещения реакторов.

### СОВМЕЩЕНИЕ БРОЖЕНИЯ И ФОТОФЕРМЕНТАЦИИ

Интеграция двух процессов с наибольшими скоростями выделения водорода дает возможность преодолеть сразу два недостатка – удалить побочные продукты темного брожения (органические кислоты) и использовать их как донор электронов для фотогетеротрофного выделения водорода (то есть решить вопрос о доноре электронов для второй стадии). Основным преимуществом такой схемы является повышение теоретически возможного выхода водорода до 12 моль на 1 моль глюкозы. Более того, становится возможным использование органических сточных вод и твердых отходов в качестве субстратов. В настоящий момент эта схема наиболее очевидная и широко изучаемая [31, 32].

Для успешного объединения этих процессов необходимо решить ряд задач: подобрать подходящие отходы (органосодержащие сточные воды или твердые отходы), организмы для обеих стадий, способ объединения стадий и соотношение

объемов темного и светового реакторов для наиболее эффективного преобразования поступающих субстратов.

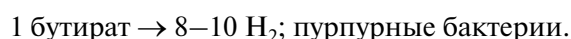
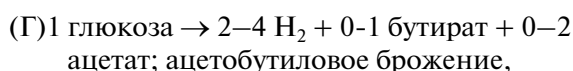
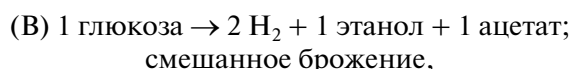
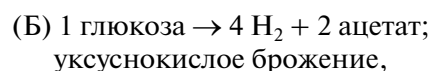
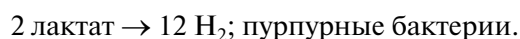
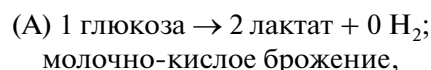
Предпосылки, на основе которых может быть сделан выбор субстрата для двухстадийной системы.

1. Органические субстраты, входящие в состав отходов, должны перерабатываться в темновой стадии с образованием продуктов, которые легко используются пурпурными бактериями.

2. Нитрогеназная активность пурпурных бактерий не должна снижаться из-за избыточной концентрации азотистых соединений, содержащихся в стоке темного биореактора первой стадии.

3. Наличие и концентрация минеральных компонентов отходов не должны лимитировать или ингибировать совмещаемые процессы.

Подбирая бактерии для двухстадийного процесса, необходимо учитывать, что, теоретически, 4 различных комбинации бактериальных метаболических путей могут давать выход 12 моль водорода при использовании 1 моль глюкозы [31]:



Однако при использовании бактериальных сообществ возникает “конкуренция” между метаболическими путями Б, В и Г. Показано, что значения рН влияют на спектр получаемых продуктов брожения и состав микробных сообществ. Так, поддержание рН ниже 6.0 приводит к доминированию ацетата и бутирата, а нейтральные значения — пропионата и органических спиртов [33]. Более того, в реальных процессах одновременно реализуется несколько типов ферментации.

Таким образом, выход водорода всей системы и состав продуктов темновой стадии зависят от способа преобразования органики в этой стадии. Более того, соотношение объемов реакторов должно подбираться, исходя из стехиометрических соотношений в уравнениях, описывающих совмещаемые процессы.

**Субстраты для первой стадии.** К модельным субстратам, используемым в лабораторной практике для изучения комбинированных систем, относятся глюкоза, сахароза, крахмал, гидролизат целлюлозы. Проводятся также и исследования с реальными органическими отходами (табл. 2, 3).

Классификация различных видов сельскохозяйственных отходов и выходы водорода, полученные при их сбраживании, описаны ранее [33]. Так, максимальные выходы наблюдались при использовании подсырной сыворотки, свиного навоза, пищевых отходов, кукурузных стеблей в качестве субстратов.

Практически все субстраты могут потребляться микроорганизмами с одновременным выделением водорода на обеих стадиях. Однако, если среда содержит избыточное количество азота, выделение водорода на второй стадии не происходит [38, 64]. Использование высоких концентраций органического сырья в первой стадии дает ингибирующие для пурпурных бактерий концентрации органических кислот во второй стадии. Для решения этих проблем многие исследователи используют различные водные разведения стока темнового реактора [53].

В некоторых случаях, эффективность фотогетеротрофного выделения водорода была низкой при разведении стока первой стадии. Обнаружено, что вследствие разведения уменьшаются концентрации не только органических кислот, но и других элементов среды — сульфатов, железа, магния [59]. Добавление фосфатов в среду, предназначенную для второй стадии, увеличивало выход водорода благодаря стабилизации рН [59]. Если в качестве субстрата для сбраживания в первой стадии использовались углеводы, вполне вероятно, что в сливе темнового реактора будет недостаточно азота для нормального роста пурпурных бактерий. Так, показано, что при использовании продукта ферментации сахарозы дополнение среды глутаматом и дрожжевым экстрактом

приводило к повышению выхода водорода с 3.07 до 5.13 моль/моль глюкозы [47].

Эффективность преобразования органических субстратов в водород в ходе двухстадийного процесса, по результатам разных исследований, колеблется от 3.1 до 7.1 моль  $H_2$ /моль глюкозы (табл. 2–3). Однако из-за того, что на эффективность выделения водорода влияют и другие параметры интегрированных систем, сделать вывод о том, какой субстрат является наиболее подходящим, не представляется возможным.

**Микроорганизмы, применяемые в темновой стадии.** В двухстадийных системах на первом этапе используются чистые культуры, их искусственные смеси или природные сообщества. Среди чистых культур наиболее широко применяются различные штаммы семейств Clostridiaceae или Enterobacteriaceae, молочнокислые бактерии, бактерии рода *Cellulomonas*, *Klebsiella* и термофильные бактерии *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* и *Thermotoga neapolitana* (табл. 2). Чистые культуры и искусственные среды удобны для лабораторных исследований, например для определения продуктов ферментации, расчета скоростей выделения водорода, определения эффективности преобразования субстратов. Для практических целей чистые культуры неперспективны из-за больших энергетических затрат на стерилизацию подаваемых сред, а также из-за того, что сообщества, в отличие от чистых культур, способны перерабатывать более широкий спектр органических веществ и относительно устойчивы [69]. Однако в естественных бактериальных сообществах присутствуют сульфатредуцирующие, гомоацетатные и метаногенные бактерии, которые, потребляя  $H_2$ , снижают эффективность всего процесса.

Для подавления нежелательных микробиологических процессов естественные сообщества обрабатывают различными химическими или физическими способами (прогревание, аэрация, обработка химическими ингибиторами метаногенеза) (табл. 3) [70, 71]. Поддержание низких значений рН также эффективно для подавления метаногенеза [72]. Применяют и создание искусственных комбинаций из уже существующих бактериальных сообществ [73, 74]. Показано, что такие искусственные бактериальные сообщества применимы в различных биотехнологических целях [75, 76]. Трудно предсказать устойчивость таких сообществ, хотя при использовании искусственно созданной смеси термофильных культур был получен высокий выход водорода — 3.7 моль/моль глюкозы [74].

В табл. 2 и 3 приведены выходы водорода (моль/моль глюкозы), полученные в темновых стадиях интегрированных процессов. Они составляли от 1.3 до 3.3 моль водорода в расчете на 1 моль гексозы, причем последняя величина была получена только в одном случае [45]. В других ис-

Таблица 2. Интегрированные системы получения водорода с применением чистых культур в первой стадии

Субстрат для темновой стадии	Источник азота*	Возбудитель первой стадии	Выход водорода в первой стадии (моль/моль глюкозы)	Доминирующие продукты первой стадии	Возбудитель второй стадии	Общий выход водорода (моль/моль глюкозы)	Ссылка
Глюкоза	—	<i>Clostridium butyricum</i>	—	—	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	7.0	[34]
Глюкоза	Пептон, ДЭ	<i>C. butyricum</i> NCIB 9576	1.3	Ацетат, бутират	<i>R. sphaeroides</i> E15-1	1.6	[35]
Глюкоза	Солодовый экстракт, ДЭ	<i>Entherobacter cloacae</i> DM 11	1.9	Ацетат	<i>R. sphaeroides</i> O.U.001	5.3	[36]
Глюкоза	Глютамаг натрия	<i>Lactobacillus debrueckii</i>	—	—	<i>R. sphaeroides</i> RV	7.1	[37]
Глюкоза	Питательный раствор Охoid (триптон, ДЭ)	<i>Escherichia coli</i> HD701	2.4	Ацетат, лактат, этанол	<i>R. sphaeroides</i> O.U. 001	2.4	[38]
Глюкоза	Пептон, мясной экстракт, цистеин	<i>Ethanoligenens harbinense</i> B49	1.8	Ацетат, этанол	<i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	6.3	[39]
Глюкоза	Глютамаг натрия, мясной экстракт, цистеин	<i>C. butyricum</i>	—	Ацетат, бутират	<i>R. faecalis</i> RLD-53	4.1	[40]
Глюкоза	Цистеин	<i>C. butyricum</i>	1.7	Ацетат, бутират	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	5.5	[41]
Глюкоза	ДЭ, триптон, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	3.1	Ацетат	<i>R. sphaeroides</i> , NCIMB 8253	5.6	[42]
Глюкоза	Мясной экстракт, цистеин	<i>C. butyricum</i>	1.6	Ацетат, бутират	<i>R. faecalis</i> RLD-53	5.4	[43]
Глюкоза	Глютамаг натрия, ДЭ, цистеин	<i>E. harbinens</i> B49	—	—	<i>R. faecalis</i> RLD-53	3.1	[44]
Сахароза	ДЭ	<i>E. cloacae</i> DM11	3.3	Ацетат	<i>R. sphaeroides</i> O.U. 001	6.7	[45]
Сахароза	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>C. pasteurianum</i> CH <sub>4</sub>	1.9	Ацетат, бутират	<i>R. palustris</i> WP3-5	7.1	[46]
Сахароза	ГК, ДЭ	<i>C. pasteurianum</i> CH <sub>4</sub>	1.9	Ацетат, бутират	<i>R. palustris</i> WP3-5	5.1	[47]
Целлюлоза	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>Cellulomonas</i> sp.	—	Ацетат, лактат, формиаг	<i>R. capsulatus</i> B100	4.3	[48]
Крахмал	ДЭ, ГК	<i>C. butyricum</i>	1.9	Ацетат, лактат, бутират	<i>Rhodobacter</i> sp. M-19	6.4	[6]



Таблица 2. Окончание

Субстрат для темновой стадии	Источник азота	Возбудитель первой стадии	Выход водорода в первой стадии (моль/моль глюкозы)	Доминирующие продукты первой стадии	Возбудитель второй стадии	Общий выход водорода (моль/моль глюкозы)	Ссылка
Проваренный крахмал ферментированный <i>Caldimonas taiwanensis</i> On1	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>C. butyricum</i> CGS2	1.4	Ацетат, бутират	<i>R. palustris</i> WP3-5	3.1	[49]
Отходы от переработки батата	Полипептон	<i>C. butyricum</i> и <i>Entherobacter aerogenes</i>	2.4	Ацетат, лактат, бутират	<i>Rhodobacter</i> sp.	7.0	[50]
Активный ил из муниципальных очистных сооружений	—	<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	—	<i>R. sphaeroides</i> RV	Темновая: 0 Н <sub>2</sub> + 850 мг/л органических кислот; Световая: 160.5 мл Н <sub>2</sub> /г органических кислот	[51]
Отходы от перегонки спирта	ДЭ	<i>Citrobacter freundii</i> 01 и <i>E. aerogenes</i> E10	—	Этанол, ацетат, бутират	<i>R. palustris</i> P2 Культивирование проводилось в темноте!!	2.8	[52]
Гидролизат мискантуса	—	<i>Thermotoga neapolitana</i>	—	Ацетат, лактат	<i>R. capsulatus</i>	—	[53]
Свекольная патока	Цистеин, ДЭ, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	2.1	Лактат, ацетат	<i>R. capsulatus</i> YO3 — hup <sup>-</sup> mutant	6.9	[44]
Сахароза	—	<i>E. coli</i> EGY и <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	2.4	—	<i>R. capsulatus</i> DSM 1710	3.5	[54]
Испорченные финики	—	—	2.6	—	—	3.9	
Картофельная кожура, обработанная α-амилазой	—	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	2.4	—	<i>R. capsulatus</i> DSM 1710	3.9	[55]
Меласса	—	—	2.1	—	—	5.8	

\*ДЭ — дрожжевой экстракт, ГК — глутаминовая кислота.

Таблица 3. Интегрированные системы получения водорода с применением гетеротрофных сообществ в первой стадии

Субстрат	Источник азота*	Возбудитель первой стадии	Обработка консорциума	Выход H <sub>2</sub> первой стадии (моль/моль глюкозы)	Доминирующие продукты первой стадии	Возбудитель второй стадии	Общий выход H <sub>2</sub> (моль/моль глюкозы)	Ссылка
Сахароза	ДЭ	Термически обработанный навоз	112°C, 5 ч	1.8	Ацетат, бутират	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> SH2C	3.3	[56]
Гидролизванный ферментативно крахмал маниоки	пептон, цистеин	Анаэробное сообщество с завода по производству метана	Кипячение 30 мин	1.8 (240 мл/г крахмала)	Ацетат, бутират	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	2.9	[57]
Проваренный пшеничный порошок	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Сообщество из ацидогенного реактора завода по очистке стоков	Концентрирование, обработка 10 ч при 90–100°C	–	–	<i>R. sphaeroides</i> NRRL B-1727	1.2	[58]
Гомогенат картофеля	Пептон	Сообщество из силосной ямы	Кипячение 10 мин, добавление Zn	1.6	Ацетат, бутират	<i>R. capsulatus</i> B10	5.6	[59, 60]
Проваренная молотая пшеница	Цистеин, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Сообщество из ацидогенного реактора завода по очистке стоков	Концентрирование, кипячение 1 час при pH 5.9	1.5	–	<i>R. sphaeroides</i> RV	4.6	[61]
Проваренная молотая пшеница	Цистеин, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Сообщество	Концентрирование, кипячение 1 час при pH 5.9	–	–	<i>R. sphaeroides</i> RV	1.5	[62]
Проваренная молотая пшеница	–	Сообщество из ацидогенного реактора завода по очистке стоков	Концентрирование, кипячение 1 час при pH 5.9	–	–	<i>R. sphaeroides</i> NRRL B-1727	0.4	[63]

\*ДЭ – дрожжевой экстракт, ГК – глутаминовая кислота.

Таблица 4. Двухстадийные системы с совместным культивированием организмов

№	Субстрат	Гетеротрофная бактерия	Пурпурная несерная бактерия	Иммобилизация	Общий выход водорода (моль/моль гексозы)	Ссылка
1	Целлюлоза	<i>Cellulomonas</i> sp.	<i>Rhodobacter capsulatus</i> B100	–	4.3	[65]
2	Глюкоза	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	+	7.0	[34]
3	Крахмал	<i>C. butyricum</i>	<i>Rhodobacter</i> sp.	–	6.4	[50]
4	Глюкоза	<i>C. butyricum</i>	<i>R. sphaeroides</i>	+	–	[66]
5	Глюкоза	<i>Lactobacillus debrueckii</i>	<i>R. sphaeroides</i> RV	+	7.1	[37]
6	Отходы от перегонки спирта	<i>Citrobacter freundii</i> 01 и <i>Enterobacter aerogenes</i> E10	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> P2 Культивирование проводилось в темноте!!!	–	2.8	[52]
7	Глюкоза	<i>C. butyricum</i>	<i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	+	4.1	[40]
8	Проваренная измельченная пшеница	Сообщество	<i>Rhodobacter</i> sp.	–	1.2	[58]
9	Проваренный, отфильтрованный пшеничный порошок	Сообщество	<i>R. sphaeroides</i> RV	–	1.1	[62]
10	Глюкоза	<i>Ethanoligenes harbinense</i> B49	<i>R. faecalis</i> RLD-53	+	3.1	[67]
11	Проваренный пшеничный порошок	Сообщество	<i>R. sphaeroides</i> RS-NRRL	–	0.4	[63]

следованиях показаны значительно меньшие значения.

**Микроорганизмы, применяемые в фотосинтетической стадии.** Пурпурные серные и несерные бактерии и зеленые серные бактерии – теоретически возможные кандидаты для применения во второй стадии совмещенных биосистем. Пурпурные несерные бактерии используют широкий спектр органических субстратов и способны быстро расти за счет дыхания, а в анаэробных условиях проявляют очень высокую нитрогеназную активность и, соответственно, скорость выделения водорода [77]. Напротив, пурпурные и зеленые серные бактерии более чувствительны к кислороду, обладают меньшей скоростью роста и нитрогеназной активностью. Поэтому большинство исследователей используют в совмещенных системах пурпурные несерные бактерии: *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobium marinum* и некоторые новые неидентифицированные штаммы (табл. 2–6). Продолжаются работы по выделению штаммов приспособленных для использования в двухстадийных системах [64, 78]. Использование смешанных культур пурпурных несерных бактерий увеличивало скорость образования водорода, эффективность преобразования субстратов и общий выход водорода [79]. Несмотря на то что устойчивость чистых культур пурпурных бактерий и их смесей в нестерильных условиях – предмет будущих исследований, показана принципиальная возможность выделения водорода в нестерильных условиях фотогетеротрофными пурпурными бактериями [80].

Отдельным направлением улучшения выделения водорода пурпурными несерными бактериями является их генетическая модификация. Так, например, проводилось уменьшение коровой и периферической антенны для снижения эффекта самозатенения культуры и увеличения эффективности поглощения света [81], удаление большой субъединицы водородпоглощающей гидрогеназы (*hupL* ген) [82] или обеих субъединиц (*hupSL*) [83, 84], а также удаление *hupSL* одновременно с геном синтеза полигидроксиалканатов (ПГА) [40] у *Rhodobacter sphaeroides*, клонирование кластридальной (*hydA*) или сверхэкспрессия гидрогеназы (*hydC*), содержащей только железо в активном центре, в *Rhodospirillum rubrum* [85]. Все перечисленные генетические модификации бактерий приводили к некоторому увеличению выделения водорода.

**Соотношение объемов темного и светового реакторов.** Оптимальное соотношение объемов реакторов зависит от конечной цели. Если конечной целью является полная очистка органических отходов, то скорости выделения водорода будут понижены. Объемы реакторов должны рассчитываться на основе полного поглощения органических кислот, полученных при максимальном разложении отходов в первой стадии.

Если конечная цель – это получение водорода с максимальной скоростью, то при подборе объемов реакторов необходимо учитывать оптимальные концентрации субстратов для получения максимальных скоростей.

Таблица 5. Двухстадийные системы с последовательным культивированием организмов

№	Субстрат	Гетеротрофная бактерия	Обработка стока темного процесса	Пурпурная несерная бактерия	Максимальный суммарный выход водорода (моль на моль глюкозы)	Ссылка
1	Крахмал	<i>Clostridium butyricum</i>	Центрифугирование (ц/ф), автоклавирование (а/к)	<i>Rhodobacter</i> sp. M-19	3.6 (1.9 + 1.7)	[6]
2	Отходы от переработки багата	<i>C. butyricum</i> и <i>Enterobacter aerogenes</i>	Доведение рН до 7.5, добавление Мо и ЭДТА	<i>Rhodobacter</i> sp.	7.0 (2.4 + 4.6)	[50]
3	Глюкоза (пептон, дрожжевой экстракт)	<i>C. butyricum</i> NCIB 9576	—	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> E15-1	1.6	[35]
4	Глюкоза	<i>Enterobacter cloacae</i> DM 11	—	<i>R. sphaeroides</i> O. U.001	5.3 (1.9 + 3.4)	[36]
5	Глюкоза	<i>Escherichia coli</i> HD701	Разведение (1 : 2), ц/ф, ультра-фильтрация	<i>R. sphaeroides</i> O. U. 001	2.4 (2.4 + 0)	[38]
6	Сахароза	Сообщество	Разведение, ц/ф, доведение рН	<i>R. sphaeroides</i> SH2C	3.3 (1.8 + 1.5)	[56]
7	Сахароза	<i>E. cloacae</i> DM11	Разведение, ц/ф	<i>R. sphaeroides</i> O. U. 001	6.7 (3.3 + 3.4)	[45]
8	Сахароза	<i>C. pasteurianum</i> CH <sub>4</sub>	Разведение, ц/ф, доведение рН	<i>R. palustris</i> WP3-5	7.1 (1.9 + 5.2)	[46]
9	Проваренный крахмал гидролизованый <i>Calditonas taiwanensis On I</i>	<i>C. butyricum</i> CGS2	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН, добавление дрожжевого экстракта, Fe	<i>R. palustris</i> WP3-5	3.1 (1.4 + 1.7)	[49]
10	Глюкоза	<i>Ethanoligenens harbinense</i> B49	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН	<i>R. faecalis</i> RLD-53, иммобилизованная в агар.	6.3 (1.8 + 4.5)	[39]
11	Гидролизат мискантуса	<i>Thermotoga neapolitana</i>	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН, добавление буфера	<i>R. capsulatus</i>	—	[53]
12	Гидролизанный ферментативно ( $\alpha$ -амилаза и глюкоамилаза) крахмал маниоки	Анаэробное сообщество, выделенное на заводе по производству метана	Разведение, ц/ф, а/к, фильтрация, доведение рН до 7.0, добавление некоторых минеральных солей	<i>R. palustris</i>	2.9	[57]

Таблица 5. Окончание

№	Субстрат	Гетеротрофная бактерия	Обработка стока темнового процесса	Пурпурная несерная бактерия	Максимальный суммарный выход водорода (моль на моль глюкозы)	Ссылка
13	Гомогенат картофеля	Сообщество	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН до 6, 8, добавление Fe, Mg	<i>R. capsulatus</i> B10	5.6 (1.6 + 4.0)	[59, 60]
14	Глюкоза	<i>C. butylicum</i>	Разведение, ц/ф, фильтрование, добавление базовой среды для фотогетеротрофных организмов	<i>R. palustris</i>	5.5 (1.3 + 4.2)	[41]
15	Глюкоза	<i>C. saccharorebutylacetonicum</i> N1-4	а/к	<i>R. sphaerooides</i> , NCIMB 8253	5.6 (3.1 + 2.5)	[42]
16	Свекольная патока	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Разведение, ц/ф, а/к, добавление Fe и Mo	<i>R. capsulatus</i> YO3 – hup <sup>-</sup> мутант	6.9 (2.1 + 4.8)	[44]
17	Картофельная кожура, обработанная α-амилазой	<i>C. saccharolyticus</i>	Разведение, ц/ф, а/к, добавление буфера, Fe и Mo, витамины	<i>R. capsulatus</i> DSM1710	3.9 (2.4 + 1.5)	[55]
	Меласса				5.8 (2.1 + 3.7)	
18	Проваренная молотая пшеница.	Сообщество	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН до 10.0, добавление ЭДТА и Fe, аэрация (для удаления NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	<i>R. sphaerooides</i> RV	4.6 (1.5 + 3.0)	[61]
19	Проваренная молотая пшеница.	Сообщество	Разведение, ц/ф, доведение рН до 7.0, добавление Mo, Fe, Mg, ЭДТА, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>R. sphaerooides</i> NRRL B-1727	– (– + 0.9)	[68]
20	Глюкоза	<i>C. butylicum</i>	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН до 7.0	<i>R. faecalis</i> RLD-53	5.4 (1.6 + 3.8)	[43]
21	Сахароза	<i>C. pasteurianum</i> CH <sub>4</sub>	Разведение, ц/ф	<i>R. palustris</i> WP3-5	5.1 (1.9 + 3.2)	[47]

Таблица 6. Двухстадийные системы с автоматизированным объединением реакторов

Субстрат	Гетеротрофная бактерия	Пурпурная несерная бактерия	Конструктивные особенности совмещенного реактора	Суммарный выход водорода (моль/моль гексозы)	Ссылка
Активный ил из муниципальных очистных сооружений	<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	Одновременно работающие фото- и темновой реакторы с промежуточным мембранным реактором	Темновая – 0 H <sub>2</sub> + 850 мг/л органических кислот, Световая – 160.5 мл H <sub>2</sub> /г органических кислот	[51]

Различные процессы на первой стадии (А–Г, см. выше), дают разную стехиометрию образования водорода и других продуктов. Поэтому для каждого из них требуются свои расчеты относительных объемов реакторов. Кроме того, необходимо учитывать и относительные скорости процессов в темновом и световом реакторах.

В литературе приводятся подобные данные. Так, темновому реактору объемом 80 л должен соответствовать фотореактор объемом 7684 л, то есть должна соблюдаться пропорция 1 : 96 [31]. Расчеты объемов реакторов с учетом продуктов сбраживания картофельного гомогената в искусственной среде дали отношение 1 : 10 для темновой и световой стадий интегрированного процесса [59]. Существенные различия в полученных результатах говорят о необходимости дальнейших исследований этого вопроса.

**Способы объединения двух стадий.** Использование слива темнового реактора непосредственно в качестве субстрата для фотобиореактора до настоящего времени остается сложной задачей. Однако показана принципиальная возможность получения водорода из необработанного стока в периодической культуре [64]. Такой подход привлекателен в плане практического применения и требует дальнейшего изучения. Возможные причины пониженного выхода водорода.

1. Различие в оптимумах рН. В ходе темнового сбраживания органики с контролируемым рН было показано, что оптимальным значением является рН 4.5–6.0 [86]. В то же время границы оптимума для пурпурных несерных бактерий 6.5–9.0 [87]. *Rhodospseudomonas acidophila* [88] имеет пониженный оптимум рН для роста (ниже 6.0), но скорости роста и выделения водорода в таких условиях не изучены.

2. Различие в температурных оптимумах. Оптимум для энтеробактерий и многих видов рода *Clostridia* 35–40°C. Пурпурные бактерии – мезофилы, их температурный оптимум приходится на 28–30°C. В случае использования термофильных культур сток темнового процесса должен охлаждаться.

3. Затенение фототрофных культур взвешенными частицами (клетки бактерий, их споры и непрозрачные частицы твердых отходов). Этим

обусловлена необходимость центрифугирования или фильтрации стока темнового реактора. Вместе с тем при использовании каких-либо специфических отходов, не имеющих взвешенных частиц и светопоглощающих соединений, это ограничение снимается.

4. Выделение токсических веществ. Существуют предположения о влиянии сульфида на рост пурпурных несерных бактерий [64]. Однако для большинства темновых бактерий и сообществ не изучены вещества, которые они могут выделять в среду, подавляя метаболизм пурпурных бактерий.

5. Известно, что нитрогеназная система пурпурных бактерий ингибируется и репрессируется повышенным содержанием связанных источников азота в среде [47]. Напротив, для более эффективного функционирования первой стадии в среду добавляются азотсодержащие вещества (табл. 4, 5), что может привести к понижению выхода водорода на второй стадии.

6. Концентрации органических кислот в сливе темнового реактора могут изменяться в широких пределах в зависимости от изменений подаваемого субстрата. Суммарные концентрации органических кислот в продуктах темновых процессов достигали более 50 [39, 44] и даже более 100 мМ [55, 56]. При концентрациях органических кислот выше 50 мМ наблюдается снижение выделения водорода пурпурными бактериями [89, 90]. Таким образом, необходимость поддержания оптимальной концентрации органических кислот для пурпурных бактерий часто вынуждает разводить ферментационные жидкости перед подачей в фотобиореактор (табл. 5).

Интересной особенностью является то, что пурпурные бактерии избирательно поглощают органические кислоты из смеси [44, 90, 91]. Кислоты с большей длиной углеродной цепи поглощаются позже. Это свойство можно использовать, создавая несколько последовательных фотобиореакторов или иммобилизовать несколько видов пурпурных бактерий в одном реакторе послойно для более полного использования длинноцепочечных органических кислот. Приведенные факты подтверждают необходимость поиска оптимальной предварительной обработки ферментационных стоков (табл. 5).

**Совместное культивирование.** Совмещение двух стадий получения водорода в одном пространстве – метод, привлекающий внимание своей простотой и экономичностью. В лабораторных экспериментах различные виды гетеротрофных бактерий или сообщества совмещают с пурпурными несерными бактериями в одной питательной среде (табл. 4). При этом не соблюдаются условия оптимумов роста и выделения водорода смешиваемых культур, прежде всего рН, что снижает эффективность процесса или скорость выделения водорода. Так, в системе с *Clostridium butyricum* и *Rhodobacter sphaeroides* с использованием глюкозы в качестве субстрата выделение водорода прекращалось уже через 3 сут культивирования из-за снижения рН до 6.5, в то время как в среде оставались ацетат (11.5 мМ) и бутират (13.5 мМ) [92]. Использование иммобилизованных культур дает возможность получать более высокие выходы водорода (табл. 4) [34, 37, 40, 66, 67]. Это можно объяснить тем, что иммобилизованные культуры имеют обособленное микроокружение, то есть отдельные области матрицы могут иметь разные значения рН, которые оказываются оптимальными для той или иной культуры.

**Последовательное объединение процессов.** Раздельное осуществление микробных процессов снимает все ограничения, перечисленные в предыдущем разделе. В такой системе сток темного реактора собирается и после обработки используется в качестве субстрата для фотоферментации. Из табл. 5 видно, что основными этапами обработки чаще всего являются разведение, стерилизация, центрифугирование и доведение рН до оптимальных значений. В некоторых случаях применяют фильтрование (табл. 5) [38, 41, 57] для освобождения ферментационного стока от непрозрачных частиц, затеняющих фототрофную культуру, или для отделения биологических компонентов (клетки, споры). Возможно использование азрации при повышенном содержании аммония (табл. 5) [61]. В зависимости от концентрации органических кислот в сброженном субстрате может потребоваться его разведение. Если разведение значительное, то перед подачей в световой реактор необходимо дополнять ферментационный сток минеральными компонентами и (или) буферными растворами. В результате эффективность интегрированного процесса варьирует от 1.6 до 7.1 моль водорода на 1 моль глюкозы (табл. 5). Такой подход в совмещении процессов удобен, когда различные стадии осуществляются в разных лабораториях, но его экономическая целесообразность требует дальнейшего изучения.

**Автоматизированное совмещение двух процессов, протекающих одновременно в разных реакторах.** Основными трудностями как совмещенных, так и разделенных реакторов является необходимость поддержания различных физико-химических условий для двух стадий, как указывалось

выше, а также необходимость отделения непрозрачных частиц ферментационной среды при ее перемещении в реактор для пурпурных несерных бактерий. Недавно была предложена система параллельно работающих биореакторов (темновой и фотобиореактор) для получения водорода из активного или муниципальных очистных сооружений (табл. 6) [51]. В описанной системе биореакторы отличались микроорганизмами, но жидкая фаза была единой. Для этого в системе реакторов существовал дополнительный объем, оснащенный диализной мембраной из полых волокон-микротрубок (диаметр пор 0.1 мкм), через которую среда из темного реактора попадала в фотобиореактор. Вся система поддерживалась при 35°C. В ходе темнового сбраживания образования водорода не наблюдалось. Однако общее содержание органических кислот в используемых отходах после сбраживания увеличивалось с 250 до 1100 мг/л. Фотогетеротрофное образование водорода шло со скоростью 100 мл/л/сут, образуя 160 мл H<sub>2</sub>/г органических кислот [51].

Предложенный подход перспективен ввиду рационального использования пространства в системе, сокращения общего времени ферментации и упрощения конструкции.

#### ИНТЕГРАЦИЯ ФОТОВАТРОФНОГО НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ И ЕЕ ДВУХСТАДИЙНОЙ ДЕГРАДАЦИИ

Если заменить органический субстрат, используемый для двухстадийной системы, описанной выше на биомассу микроводорослей, то возможно создание трехстадийной системы (рис. 2). Фототрофное накопление полисахаридов микроводорослями идет без выделения водорода, хотя есть и преимущества: единственным источником энергии для такой системы является солнечный свет; система замкнута с точки зрения выброса углекислого газа, который может использоваться микроводорослями; разработаны эффективные методы выращивания биомассы микроводорослей как в закрытых реакторах, так и в открытых системах [93]; микроводоросли способны поглощать избыточный азот и фосфор, которые приводят к эвтрофикации водоемов [19, 94]; можно использовать морскую воду, что уменьшает общую стоимость процесса. Микроводоросли характеризуются высокими скоростями роста и эффективным фотосинтезом, но из-за снижения обеспеченности культуры светом при большой концентрации биомассы или увеличенной толщине слоя суспензии рост может сильно замедляться.

Возможность выделения водорода при гетеротрофном сбраживании биомассы микроводорослей подтверждена несколькими исследовательскими группами [95–98]. Эффективность преобразования субстрата в водород, вычисленная на основе содержания крахмала в клетках микрово-

дорослей, достигала 7.1–8.3 моль  $H_2$  на моль глюкозы [95, 97]. Не исключено, что такие значения преувеличены, так как клетки содержат кроме крахмала другие органические соединения, пригодные для утилизации гетеротрофными микроорганизмами.

Узким местом этой системы является процесс переноса водородослевой биомассы в гетеротрофный реактор. В описанных экспериментах биомассу водородослей родов *Dunaliella* и *Chlamydomonas* подвергали временному замораживанию, для разрушения клеточных структур, что облегчало процесс сбраживания [97]. Предварительное высушивание биомассы снижало выход водорода на 20% [98]. В других случаях обработка биомассы не описывалась, но заключалась в концентрировании клеток или восстановлении биомассы из порошка [95]. Возможность прямого заполнения темного реактора живыми микроводородослями требует дополнительных исследований.

#### СОВМЕЩЕНИЕ МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ (МТЭ) С БРОЖЕНИЕМ

Продукты темного брожения – органические вещества, которые могут перерабатываться бактериями в водород, но в анаэробных условиях для этого необходима дополнительная энергия. Так, при выделении водорода в ходе аноксигенного фотосинтеза (фотоферментация) используется энергия света. Альтернативой использования аноксигенного фотосинтеза служит подход, в котором ацетат преобразуется в водород в микробном топливном элементе с затратой электрического тока [25]. МТЭ состоит из катода, катализирующего восстановление кислорода, и анода, снабженного электрогенными бактериями, которые способны окислять органику на поверхности анода и генерировать электрический ток. Недостатком такой системы является то, что кислород, подаваемый в катодное пространство, диффундирует к аноду и ингибирует брожение. МТЭ может быть преобразован в микробную электролизную ячейку, если в ячейке с катодом создать анаэробизацию и приложить электрический ток (при потенциале более –200 мВ). В этом случае электрогенные бактерии используют электроны от электрода, осуществляя “электротрофный” тип питания. При этом катод выполнен из платины, и в катодном пространстве образуется  $H_2$ .

При использовании ацетата в качестве субстрата для бактерий [25] общее количество восстановленных до водорода электронов составляло более 90%, то есть при приложении оптимального напряжения выход водорода составлял 2.9 моль на 1 моль ацетата. Усовершенствование технологии эксперимента повысило эффективность получения водорода до 99% при напряже-

нии 0.8 В [99]. В более поздних работах показано выделение водорода с общей эффективностью процесса до 92% в МТЭ при использовании глюкозы, масляной, молочной, пропионовой и валириановой кислот, а также целлюлозы [100]. Недавно появилось сообщение о разработке безмембранной единой ячейки МТЭ [101], в которой уменьшено внутреннее сопротивление за счет близкого расположения электродов. Средняя эффективность системы в данном исследовании составляла 78%, а максимальная – 86%. Скорость выделения водорода достигала 3.12 л  $H_2$  на 1 литр реактора в 1 сут.

Показана возможность применения МТЭ при использовании сточных вод свиной фермы [102], стока реактора, производящего водород совместно с этанолом [103], и в двухстадийной системе, сочетающей брожение и биоэлектрогенерацию водорода [104]. Таким образом, совмещение микробных топливных элементов с темновой ферментацией позволит преобразовывать практически любые органические субстраты в водород с высокой эффективностью. К сожалению, удельные скорости процесса пока далеки от практически значимых.

#### ИНТЕГРАЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА С ТЕМНЫМ СБРАЖИВАНИЕМ В ОДНОМ ОРГАНИЗМЕ

В ходе фотосинтеза микроводоросли синтезируют запасные вещества, которые в дальнейшем могут использоваться как субстраты дыхания или брожения. Если микроводоросли находятся в темновых анаэробных условиях, продуктами их метаболизма становятся водород и органические кислоты, которые, в свою очередь, могут использоваться для фотоферментации и, следовательно, выделения водорода пурпурными бактериями.

Ранее был выделен штамм рода *Chlamydomonas* с относительно высокой эффективностью образования водорода при брожении [22], которая составляла 2 моль  $H_2$  на 1 моль глюкозы (рассчитано по потреблению крахмала). Другими идентифицированными продуктами брожения были уксусная кислота и этанол. Для того чтобы увеличить количество водорода, культуральную жидкость, содержащую органические кислоты, направляли в реактор с пурпурной бактерией *Rhodovulum sulfidofilum* W1S [105].

Подобное объединение процессов повысило эффективность системы до 10.5 моль  $H_2$  на 1 моль глюкозы. Следует отметить, что выделение водорода пурпурной бактерией продолжалось и после полной утилизации ацетата и этанола, что свидетельствует о наличии в среде и других продуктов метаболизма микроводорослей. Был создан био-реактор, где использовались данные штаммы, но, несмотря на то что процесс выделения водорода



оказался стабильным и продолжительным, эффективность системы понизилась до 5.8 моль  $H_2$  на 1 моль глюкозы [106, 107].

В описанной интегрированной системе на первой стадии могут быть использованы и цианобактерии, метаболизм которых изучался в условиях цикла свет – темнота (*Mycricystis aerogenosa* [106] и *Gloeocapsa alpicola* [108]). Однако опубликованных данных об объединении цианобактерий и пурпурных несерных бактерий пока нет.

Преимуществами данной схемы интеграции является то, что единственным источником энергии для микроводорослей (или цианобактерий) и пурпурных бактерий является свет, а также, что эти организмы способны выделять водород в морской воде.

### ИНТЕГРИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ УЛАВЛИВАНИЯ ЭНЕРГИИ СВЕТА

Учитывая различия в спектрах поглощения микроводорослей (400–750 нм) и пурпурных бактерий (400–1100 нм), логично совместить их для более полного использования энергии света. Было показано, что возможно совместное культивирование *Clamydomonas reinhardtii* и *Rhodospirillum rubrum* в одной среде [109], при этом в зависимости от интенсивности света в культуре преобладают одни или другие организмы. Недостатком такой системы является то, что при фотосинтезе зеленые микроводоросли выделяют кислород, блокирующий нитрогеназу и Fe-Fe гидрогеназу, что затрудняет получение водорода. Создание реактора с двумя различными отсеками для культивирования фототрофных организмов сможет решить эту проблему, но экспериментальные данные, описывающие такой подход, пока не опубликованы.

\*\*\*

Таким образом, анализ данных литературы и собственных результатов свидетельствует о том, что все предложенные интегрированные системы устраняют недостатки отдельных процессов. Более того, объединение процессов приводит к увеличению суммарной эффективности. Однако на пути к созданию новых биотехнологий существует еще множество нерешенных вопросов. Одним из них является вопрос о способе совмещения биологических процессов, т.к. описанные схемы либо высокочрезмерно затратны (требуют обработки ферментационных стоков перед использованием во второй стадии), либо малоэффективны. Другим слабоизученным вопросом является стабильность и эффективность фотоферментации при использовании сброженных отходов, состав которых может резко меняться.

Проблема интеграции разложения органических отходов и МТЭ в режиме потребления тока также перспективна, хотя для практического использования имеется множество нерешенных вопросов. Среди них следует особо выделить стабильность процесса и повышение удельной скорости. Узким местом МТЭ является также протоннообменная мембрана из-за ее недолговечности, высокой стоимости и повышенного сопротивления [110]. Необходим тщательный подбор катализатора для такой системы, так как платина и другие металлические катализаторы чувствительны ко многим продуктам брожения, например  $H_2S$ , CO и серосодержащим пептидам.

С появлением различных интегрированных систем биологического получения водорода появились и новые вопросы. Наряду с дальнейшим изучением отдельных процессов, необходимо интенсивно исследовать и интегрированные системы, поскольку их перспективность очевидна.

Работа поддержана проектом РФФИ №11-04-01383.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Das D., Veziroglu T.N. // Int. J. Hydrogen. Energ. 2001. V. 26. № 6. P. 13–28.
2. Nath K., Das D. // Appl. Microbiol. Biot. 2004. V. 65. № 5. P. 520–529.
3. Wu S.-Y., Hung C.-H., Lin C.-N., Chen H.-W., Lee A.-S., Chang J.-S. // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 93. № 5. P. 934–946.
4. Levin D.B. // Int. J. Hydrogen Energ. 2004. V. 29. № 13. P. 1425–1426.
5. Levin D.B., Pitt L., Love M. // Int. J. Hydrogen Energ. 2004. V. 29. № 2. P. 173–185.
6. Yokoi H., Mori S., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y. // Biotechnol. Lett. 1998. V. 20. № 9. P. 895–899.
7. Turker L., Gumus S., Tapan A. // J. Sci. Ind. Res. India. 2008. V. 67. № 11. P. 994–1016.
8. Bott M., Thauer R.K. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 179. № 2. P. 469–472.
9. Call D.F., Wagner R.C., Logan B.E. // Appl. Environ. Microb. 2009. V. 75. № 24. P. 7579–7587.
10. Geelhoed J.S., Stams A.J. // Environ. Sci. Technol. 2011. V. 45. № 2. P. 815–820.
11. Bolton J.R. // Sol. Energy. 1996. V. 57. № 1. P. 37–50.
12. Rakhely G., Kovacs A.T., Maroti G., Fodor B.D., Csandi G., Latinovics D., Kovacs K.L. // Appl. Environ. Microb. 2004. V. 70. № 2. P. 722–728.
13. Rakhely G., Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A., Kovacs K.L. // BBA-Bioenergetics. 2007. V. 1767. № 6. P. 671–676.
14. Cournac L., Guedeney G., Peltier G., Vignais P. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 6. P. 1737–1746.
15. Suda S., Kumazawa S., Mitsui A. // Arch. Microbiol. 1992. V. 158. № 1. P. 1–4.
16. Borodin V.B., Rao K.K., Hall D.O. // Mar. Biol. 2002. V. 140. № 3. P. 455–463.
17. Liu J.G., Bukatin V.E., Tsygankov A.A. // Int. J. Hydrogen Energ. 2006. V. 31. № 11. P. 1591–1596.
18. Wykoff D.D., Davies J.P., Melis A., Grossman A.R. // Plant. Physiol. 1998. V. 117. № 1. P. 129–139.

19. Hernandez J.P., De-Bashan L.E., Bashan Y. // *Enzyme Microb. Tech.* 2006. V. 38. № 1–2. P. 190–198.
20. Asada Y., Miyake M., Tomizuka N. // *Photosynth. Res.* 1992. V. 34. № 1. P. 128.
21. Troshina O., Serebryakova L., Sheremetieva M., Lindblad P. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2002. V. 27. № 11–12. P. 1283–1289.
22. Miura Y., Ohta S., Mano M., Miyamoto K. // *Agric. Biol. Chem.* 1986. V. 50. № 11. P. 2837–2844.
23. Sauter M., Boehm R., Boeck A. // *Mol. Microbiol.* 1992. V. 6. № 11. P. 1523–1532.
24. Kerby L., Ludden P.W., Roberts G.P. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 8. P. 2241–2244.
25. Liu H., Grot S., Logan B.E. // *Environ. Sci. Technol.* 2005. V. 39. № 11. P. 4317–4320.
26. Цыганков А.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2007. Т. 43. № 3. С. 279–288.
27. Gaffron H., Rubin J. // *J. Gen. Physiol.* 1942. V. 26. № 2. P. 219–240.
28. Бойченко В.А., Сатина Л.Я., Литвин Ф.Ф. // *Физиология растений.* 1989. Т. 36. № 2. P. 239–248.
29. Melis A., Zhang L.P., Forestier M., Ghirardi M.L., Seibert M. // *Plant. Physiol.* 2000. V. 122. № 1. P. 127–135.
30. Tsygankov A.A., Kosourova S.N., Tolstygina I.V., Ghirardi M.L., Seibert M. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2006. V. 31. № 11. P. 1574–1584.
31. Redwood M.D., Paterson-Beedle M., Macaskie L.E. // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2009. V. 8. № 2. P. 140–185.
32. Ren N.Q., Wang A.J., Cao G.L., Xu J.F., Gao L.F. // *Biotechnol. Adv.* 2009. V. 27. № 6. P. 1051–1060.
33. Guo X.M., Trably E., Latrille E., Carrere H., Steyer J.-P. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 19. P. 10660–10673.
34. Miyake J., Mao X.-Y., Kawamura S. // *J. Ferment. Technol.* 1984. V. 62. № 6. P. 531–535.
35. Kim M.-S., Lee T.J., Yoon Y.S., Lee I.G., Moon K.W. // *Biohydrogen II. An approach to environmentally acceptable technology* / Eds. J. Miyake, T. Matsunaga, A. San Pietro. Amsterdam: Pergamon Press, 2001. P. 263–272.
36. Nath K., Kumar A., Das D. // *Appl. Microbiol. Biot.* 2005. V. 68. № 4. P. 533–541.
37. Asada Y., Tokumoto M., Aihara Y., Oku M., Ishimi K., Wakayama T., Miyake J., Tomiyama M., Kohno H. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2006. V. 31. № 11. P. 1509–1513.
38. Redwood M.D., Macaskie L.E. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2006. V. 31. № 11. P. 1514–1521.
39. Liu B.F., Ren N.Q., Xing D.F., Ding J., Zheng G.X., Guo W.Q., Xu J.F., Xie G.J. // *Bioresource Technol.* 2009. V. 100. № 10. P. 2719–2723.
40. Ding J.L.B., Ren N.Q., Xing D.F., Guo W.Q., Xu J.F., Xie G. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 9. P. 3647–3652.
41. Su H.B., Cheng J., Zhou J.H., Song W.L., Cen K.F. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 21. P. 8846–8853.
42. Alalayah W.M., Kalil M.S., Kadhum A.A.H., Jahim J.M., Jaapar S.Z.S., Alauj N.M. // *Pak. J. Biol. Sci.* 2009. V. 12. № 22. P. 1462–1467.
43. Liu B.F., Ren N.Q., Xie G.J., Ding J., Guo W.Q., Xing D.F. // *Bioresource Technol.* 2010. V. 101. № 14. P. 5325–5329.
44. Ozgur E., Mars A.E., Peksel B., Louwerse A., Yucel M., Gunduz U., Claassen P.A.M., Eroglu I. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 2. P. 511–517.
45. Nath K., Muthukumar M., Kumar A., Das D. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 4. P. 1195–1203.
46. Chen C.Y., Yang M.H., Yeh K.L., Liu C.H., Chang J.S. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 21. P. 4755–4762.
47. Chen C.Y., Yeh K.L., Lo Y.C., Wang H.M., Chang J.S. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 24. P. 13356–13364.
48. Odom J.M., Wall J. // *Appl. Env. Microbiol.* 1983. V. 45. № 4. P. 1300–1305.
49. Lo Y.C., Chen S.D., Chen C.Y., Huang T.I., Lin C.Y., Chang J.S. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 19. P. 5224–5233.
50. Yokoi H., Saitsu A., Uchida H., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y. // *J. Biosci. Bioeng.* 2001. V. 91. № 1. P. 58–63.
51. Jeong T.Y., Cha G.C., Yoo I.K., Kim D.J. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2007. V. 32. № 5. P. 525–530.
52. Vatsala T.M., Raj S.M., Manimaran A. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 20. P. 5404–5415.
53. Uyar B., Schumacher M., Gebicki J., Modigell M. // *Bioproc. Biosyst. Eng.* 2009. V. 32. № 5. P. 603–606.
54. Abd-Alla M.H., Morsy F.M., El-Enany A.E. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2011. V. 36. № 21. P. 13518–13527.
55. Ozgur E., Afsar N., de Vrije T., Yucel M., Gunduz U., Claassen P.A.M., Eroglu, I. // *J. Clean Prod.* 2010. V. 18. № S1. P. S23–S28.
56. Tao Y., Chen Y., Wu Y., He Y., Zhou Z. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2007. V. 32. № 2. P. 200–206.
57. Su H.B., Cheng J., Zhou J.H., Song W., Cen K. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 4. P. 1780–1786.
58. Argun H., Kargi F., Kaplan I.K. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 15. P. 6181–6189.
59. Laurinavichene T., Belokopytov B.F., Laurinavichius K.S., Tekucheva D.N., Seibert M., Tsygankov A. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 16. P. 8536–8543.
60. Belokopytov B.F., Laurinavichius K.S., Laurinavichene T.V., Ghirardi M.L., Seibert M., Tsygankov A.A. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 8. P. 3324–3332.
61. Argun H., Kargi F. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 4. P. 1595–1603.
62. Argun H., Kargi F. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 4. P. 1604–1612.
63. Ozmihci S., Kargi F. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 37. № 4. P. 341–347.
64. Lee C.M., Chen P.C., Wang C.C., Tung Y.C. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2002. V. 27. № 11–12. P. 1309–1313.
65. Odom J.M., Peck H.D.J. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1984. V. 38. № 7. P. 551–592.
66. Zhu H., Wakayama T., Asada Y., Miyake J. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2001. V. 26. № 11. P. 1149–1154.
67. Xie G.J., Feng L.B., Ren N.Q., Ding J., Liu C., Xing D.F., Qian G.W., Ren H.Y. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 5. P. 1929–1935.
68. Ozminchi S., Kargi, F. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 13. P. 6674–6680.
69. Brenner K., You L.C., Arnold F.H. // *Trends Biotechnol.* 2008. V. 26. № 9. P. 483–489.
70. Ren N.Q., Guo W.Q., Wang X.J., Xiang W.S., Liu B.F., Wang X.Z., Ding J., Chen Z.B. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 16. P. 4318–4324.
71. Li C.L., Fang H.H.P. // *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 2007. V. 37. № 1. P. 1–39.
72. Luo G., Karakashev D., Xie L., Zhou Q., Angelidaki I. // *Biotechnol. Bioeng.* 2011. V. 108. № 8. P. 1816–1827.

73. Collet C., Gaudard O., Peringer P., Schwitzguebel J.P. // *J. Biotechnol.* 2005. V. 118. № 3. P. 328–338.
74. Zeidan A.A., Radstrom P., van Niel E.W.J. // *Microb. Cell Fact.* 2010. V. 9. P. 102–115.
75. Fu N., Peiris P., Markham J., Bavor J. // *Enzyme Microb. Tech.* 2009. V. 45. № 3. P. 210–217.
76. Qian M., Tian S., Li X., Zhang J., Pan Y., Yang X. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006. V. 134. № 3. P. 273–284.
77. Dasgupta C.N., Gilbert J.J., Lindblad P., Heidorn T., Borgvang S.A., Skjanes K., Das D. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 19. P. 10218–10238.
78. Tao Y., He Y., Wu Y., Liu F., Li X., Zong W., Zhou Z. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 3. P. 963–973.
79. Argun H., Kargi F., Kapdan I.K. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 24. P. 7405–7412.
80. Mohan S.V., Srikanth S., Dinakar P., Sarma P.N. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 2. P. 559–569.
81. Vasilyeva L., Miyake M., Khatipov E., Wakayama T., Sekine M., Hara M., Nakada E., Asada Y., Miyake J. // *J. Biosci. Bioeng.* 1999. V. 87. № 2. P. 619–624.
82. Zhu R., Wang D., Zhang Y., Li J. // *Chin. Sci. Bull.* 2006. V. 51. № 21. P. 2611–2618.
83. Kars G., Gunduz U., Yucel M., Rakhely G., Kovacs K.L., Eroglu I. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 5. P. 2184–2190.
84. Kars G., Gunduz U., Rakhely G., Yucel M., Eroglu I., Kovacs K.L. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 6. P. 3056–3060.
85. Kim E.J., Lee M.K., Kim M.S., Lee J.K. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 5. P. 1516–1521.
86. Wang J., Wan W. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 2. P. 799–811.
87. Rocha J., Barbosa H.R., Wijffels R.H. // *Biohydrogen II. An approach to environmentally acceptable technology* / Eds. J. Miyake; T. Matsunaga; A. San Pietro. Amsterdam: Pergamon Press, 2001. P. 3–32.
88. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уильямс. М.: Мир, 1997. 432 с.
89. Lo Y.C., Chen S.Y., Lee C.M., Chang J.S. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2011. V. 36. № 21. P. 14059–14068.
90. Laurinavichene T.V., Tekucheva D.N., Laurinavichius K.S., Ghirardi M.L., Seibert M., Tsygankov A.A. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 23. P. 7020–7026.
91. Uyar B., Eroglu I., Yucel M., Gunduz U. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 10. P. 4517–4523.
92. Fang H.H.P., Zhu H.G., Zhang T. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2006. V. 31. № 15. P. 2223–2230.
93. Chaumont D. // *J. Appl. Phycol.* 1993. V. 78. № 5. P. 593–604.
94. Mallick N. // *BioMetals.* 2002. V. 15. № 4. P. 377–390.
95. Kim M.S., Baek J.S., Yun Y.S., Sim S.J., Park S., Kim S.C. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2006. V. 31. № 6. P. 812–816.
96. Ike A., Kawaguchi H., Hirata K., Miyamoto K. // *Biohydrogen II. An approach to environmentally acceptable technology* / Eds. J. Miyake; T. Matsunaga; A. San Pietro. Amsterdam: Pergamon Press, 2001. P. 53–61.
97. Kawaguchi H., Hashimoto K., Hirata K., Miyamoto K. // *J. Biosci. Bioeng.* 2001. V. 91. № 3. P. 277–282.
98. Mussnug J.H., Klassen V., Schlüter A., Kruse O. // *J. Biotechnol.* 2010. V. 150. № 1. P. 51–56.
99. Cheng S.A., Logan B.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 47. P. 18871–18873.
100. Logan B.E., Call D., Cheng S., Hamelers H.V., Sleutels T.H., Jeremiasse A.W., Rozendal R.A. // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. № 23. P. 8630–8640.
101. Call D.F., Logan B.E. // *Env. Sci. Technol.* 2008. V. 42. № 9. P. 3401–3406.
102. Wagner R.C., Regan J.M., Oh S.E., Zuo Y., Logan B.E. // *Water. Res.* 2009. V. 43. № 5. P. 1480–1488.
103. Lu L., Ren N.Q., Xing D., Logan B.E. // *Biosens., Bioelectron.* 2009. V. 24. № 10. P. 3055–3060.
104. Lalaurette E., Thammannagowda S., Mohagheghi A., Maness P.C., Logan B.E. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 15. P. 6201–6210.
105. Miura Y., Saitoh C., Matsuoka S., Miyamoto K. // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992. V. 56. № 5. P. 751–754.
106. Asada Y., Kawamura S., Ho K.K. // *Phytochemistry.* 1987. V. 26. № 3. P. 637–640.
107. Miura Y., Akano T., Fukatsu K., Miyasaka H., Mizoguchi T., Yagi K., Maeda I., Ikuta Y., Matsumoto H. // *Energ. Convers. Manage.* 1997. V. 38. № 5. P. S533–S537.
108. Serebryakova L.T., Tsygankov A.A. // *Biotechnol. Progr.* 2007. V. 23. № 5. P. 1106–1110.
109. Melis A., Melnicki R. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2006. V. 31. № 11–12. P. 1563–1573.
110. Aki H., Akinobu M., Shigeo Y., Junji K., Tetsuhiko M., Hiroshi Y., Itaru I. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2005. V. 30. № 9. P. 943–952.

## Coupled Biological Hydrogen-Producing Systems: A Review

D. N. Tekucheva and A. A. Tsygankov

*Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences*

*e-mail: tekuchevadn@rambler.ru, ttt-00@mail.ru*

Received June 29, 2011

**Abstract**—Possible ways for combining various biological processes of biohydrogen production are described. Some of these processes are being intensively studied now, whereas others are theoretically feasible, but as yet have not been studied. A special focus is on the factors that influence the efficiency of coupled systems.