

ТЕКУЧЕВА ДАРЬЯ НИКОЛАЕВНА

ПУРПУРНЫЕ НЕСЕРНЫЕ БАКТЕРИИ В ДВУХСТАДИЙНОМ ПРОЦЕССЕ
ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРОДА ИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

03.02.03 - Микробиология

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2012

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте фундаментальных проблем биологии Российской Академии наук**

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Цыганков Анатолий Анатольевич

Официальные оппоненты:

Горленко Владимир Михайлович
член-корр РАЕН, доктор биологических наук,
профессор, Институт микробиологии имени
С.В. Виноградского РАН, заведующий лабораторией

Гроза Наталья Викторовна
кандидат химических наук, Московский
государственный университет тонких химических
технологий имени М.В. Ломоносова, ассистент кафедры.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии и физиологии
микрорганов им. Г.К. Скрябина РАН

Защита состоится «29» мая 2012 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, корп.12, биологический факультет МГУ, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «27» мая 2012 г

Ученый секретарь

диссертационного совета:



к.б.н. Пискункова Нина Федоровна.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы работы. Исчерпание традиционных ископаемых источников энергии и загрязнение окружающей среды продуктами их сгорания – важные проблемы современного общества. Одним из перспективных альтернативных носителей энергии является молекулярный водород. Получение водорода возможно разными способами, но биологический метод является одним из самых экологически безопасных (проходит при атмосферном давлении и температуре, близкой к комнатной). Кроме того, если в качестве субстратов использовать органические отходы, то одновременно с получением водорода возможна и их очистка. Многие бактерии способны выделять молекулярный водород, однако практическое значение могут иметь только те из них, которые обладают высокими удельными скоростями процесса. Наибольшие скорости выделения H_2 характерны для пурпурных несерных бактерий (ПНСБ), выделяющих водород в фотогетеротрофных условиях при недостатке азота, и гетеротрофных анаэробных бактерий, выделяющих водород при брожении (Цыганков, 2007; Redwood et al., 2009; Keskin et al., 2011). Гетеротрофные анаэробные бактерии способны использовать широкий спектр органических соединений для роста и выделения водорода, но при этом неизбежно происходит выделение других продуктов, в частности, органических кислот, из-за чего максимальный теоретический выход водорода достигает лишь 4 моль/моль гексозы. ПНСБ за счет энергии света способны выделять водород из простых органических субстратов, например, органических кислот. Полнота конверсии таких субстратов в водород может достигать 90% от теоретического предела (12 моль/моль гексозы).

Таким образом, два самых перспективных биологических процесса получения водорода имеют свои недостатки, но их объединение в единый процесс (использование продуктов брожения гетеротрофных анаэробных бактерий для светозависимого выделения водорода пурпурными бактериями) позволило бы получить водород с полным разложением органических соединений.

Степень разработанности проблемы:

К 2007 году (начало наших исследований) имелись лишь отдельные публикации, посвященные выделению водорода двухстадийной интегрированной системой на основе гетеротрофного брожения и светозависимого выделения водорода пурпурными бактериями. К настоящему времени количество публикаций резко возросло. Показано,

что использование продуктов ферментации для светозависимого выделения водорода пурпурными бактериями не всегда эффективно. Поэтому необходимо выявить основные факторы, снижающие выход водорода и найти пути их устранения. Кроме того, исследования темного процесса брожения и фотоферментации проводились отдельно. Мало внимания уделялось способу интеграции бактерий в единую систему, что приводило к большим энерго- и трудозатратам при обработке ферментационных жидкостей (ФЖ). Создание технологий/реакторов для интеграции двух процессов в литературе практически не описано.

Опубликовано множество работ, посвященных изучению и применению иммобилизованных культур микроорганизмов в промышленности. Известно, что при иммобилизации повышается устойчивость бактерий к неблагоприятным факторам. Показано, что иммобилизация пурпурных несерных бактерий приводит к увеличению скоростей выделения водорода (Tsygankov, 2001, 2003; Keskin et al., 2011; Uyar, 2012). Поэтому применение иммобилизованных культур ПНСБ в непрерывном процессе выделения водорода из ФЖ обосновано. В то же время для практического использования необходимо подобрать дешевую, стабильную и прозрачную матрицу.

Целью данной работы стало исследование суспензионных и иммобилизованных культур пурпурных несерных бактерий во второй стадии интегрированной системы получения водорода с использованием синтетических питательных сред, модельных органических отходов (картофельных и крахмальных ферментационных жидкостей) и реального отхода спиртовой промышленности - барды.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- Оценить толерантность пурпурных несерных бактерий к высоким концентрациям потенциальных продуктов и компонентов сред темновой ферментации.
- Разработать комплексный подход, позволяющий получать водород с максимальным выходом, основанный на имеющейся информации о составе ферментационных жидкостей и свойствах пурпурных несерных бактерий.
- Изучить возможность использования барды для получения водорода пурпурными несерными бактериями.
- Подобрать новую дешевую матрицу и отработать простую методику иммобилизации пурпурных несерных бактерий с последующим изучением непрерывного выделения водорода в фотобиореакторе.

- Разработать и испытать новый тип реактора, в котором стадия фотогетеротрофного выделения водорода пространственно объединена с темновой ферментацией.

Научная новизна. Определены допустимые концентрации ацетата, пропионата, бутирата, изобутирата, метанола, этанола, бутанола, а также цинка и меди в ферментационных жидкостях для роста и выделения водорода *Rba. capsulatus* B10. Впервые обнаружено, что из смеси органических кислот первыми потребляются органические кислоты с 2-3 атомами углерода. Впервые исследовано применение ферментированных органических субстратов (в том числе барды) в фотобиореакторе с иммобилизованной культурой в непрерывном режиме.

Практическая значимость. Показана перспективность применения суспензионных и иммобилизованных культур ПНСБ во второй стадии интегрированной системы получения водорода с использованием органических отходов. Результаты проведенных исследований, могут стать основой для создания технического задания на дальнейшие опытно-конструкторские работы. Установлено, что спиртовая барда является перспективным субстратом для двухстадийной системы получения водорода с одновременной ее очисткой. Оценена эффективность преобразования субстратов в водород и доля их потребления из модельных и реальных органических отходов для выделения водорода, и предложены методы улучшения их очистки. Для иммобилизации ПНСБ впервые применена стеклоткань, и отработан дешевый и практичный метод иммобилизации, обеспечивающий длительное выделение водорода. Обнаружено, что максимальные скорости выделения водорода при наиболее полной утилизации органических кислот возможны лишь в узком диапазоне концентраций субстратов.

Апробация результатов исследования. Результаты работы были представлены на Молодежной школе-конференции с международным участием «Возобновляемые источники энергии» (Москва, 2008), Международной конференции «Преобразование энергии света при фотосинтезе» (Пушино, 2008), Международной конференции «Молекулярная/нано-фотохимия, фотокатализ и преобразование солнечной энергии» (Каир, Египет, 2008), 13-м международном симпозиуме по фототрофным прокариотам (Монреаль, Канада, 2009), Симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2009),

14-й международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пушино, 2010), 9-й международной конференции по гидрогеназам (Упсала, Швеция, 2010), а также отмечены на конкурсе молодых ученых У.М.Н.И.К. – 2009.

Работа была проведена в рамках темы «Микроорганизмы и их ферменты как катализаторы в новых энергоемких технологиях и водородной энергетике» (Номер госрегистрации: 01200902137). Частично работа поддерживалась грантами РФФИ (08-08-12196-офи, 11-04-01383), Программой РАН «Химические аспекты энергетике», Научно-техническим проектом от Национальной Лаборатории Возобновляемых Источников Энергии (Колорадо, США) AFA-0-99178-01.

Объем и структура диссертации. Диссертация содержит 7 глав и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 157 страницах, содержит 27 таблиц, 30 рисунков и 3 приложения. Список литературы содержит 280 литературных источников, из которых 24 отечественных и 256 иностранных.

Публикации по теме работы. В рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, опубликованы 3 статьи по материалам диссертации и 2 обзорных статьи. Опубликовано 7 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В темновой стадии использовался консорциум с преобладанием бактерий рода *Clostridium*, выделенный из силосной ямы (Belokopytov, 2009). В фотостадии применялось несколько штаммов пурпурных несерных бактерий: *Rhodobacter sphaeroides* GL (Лауринавичене и др., 1988), *Rba. capsulatus* B10 (получен на кафедре микробиологии МГУ), *Rba. sphaeroides* №7 (Khusnutdinova et al., in press). Выделение водорода пурпурными несерными бактериями исследовалось при использовании среды Ормеруда, барды, а также продуктов темновой ферментации крахмала, картофеля и барды. Использовалось 2 образца спиртовой барды. Барда №1 была получена на спиртовом заводе «Кристалл» (д. Корыстово Московской области), барда №2 – на заводе «Изумруд» (г. Владикавказ).

В зависимости от целей эксперимента в среду Ормеруда добавлялись органические кислоты или их смеси, а в качестве источника азота - аммоний, глутамат натрия,

пептон или серин. Перед использованием ФЖ обрабатывалась: доводили рН до 7,0, центрифугировали, надосадочную жидкость автоклавировали.

В кратковременных экспериментах с клеточной суспензией использовалась культура с активным выделением H_2 . Измерялась эндогенная скорость выделения водорода, а затем вносились исследуемые субстраты в определенной концентрации. В продолжительных экспериментах рост и выделение водорода проходили на одной среде. Эксперименты проводились при 28-30°C и освещении интенсивностью 60-100 Вт лампами накаливания.

В качестве матрицы для иммобилизации использовалась стеклоткань (Гусь-Хрустальный), обработанная 50% серной кислотой и 5М NaOH. Затем матрица помещалась в плоскопараллельный фотобиореактор объемом 40 мл. Стерильные реакторы с матрицей заполнялись суспензией клеток *Rba. sphaeroides* GL с концентрацией бактериохлорофилла а (БХл а 25-35мг/л). Проток среды Ормеруда (30 мМ лактата и 5 мМ глутамата) начинали через сутки со скоростью 12,5 мл/ч (0,3 ч⁻¹). Выделение водорода начиналось через 24 часа после начала протока. После стабилизации скорости выделения водорода увеличивали интенсивность света до 51 Вт/м² и уменьшали концентрации лактата и глутамата до 15 мМ и 0,1 мМ соответственно (стандартная среда). В таких условиях измерялась контрольная скорость выделения водорода (принимаемая за 100%). Исследуемые среды подавались до стабилизации процесса выделения водорода (2-4 дня), отбирались необходимые пробы, затем среда заменялась стандартной для измерения контрольной скорости выделения водорода.

Для решения задачи интегрирования двух микробиологических процессов в одном объеме был разработан биореактор, состоящий из двух плоскопараллельных реакторов (по 76 мл), соединенных диффузионными отверстиями (4, 16 или 36 отверстий, d=3 мм или 12 отверстий, d=5 мм) с диализной мембраной (Spectra/Por MWCO 3,5кДа).

Выделение водорода оценивалось хроматографически («ЛХМ 80», детектор – катарометр, газ-носитель – аргон, колонка (1 м x 3 мм), заполненная молекулярным ситом, при 40°C) с учетом избыточного давления (в сосудах объемом до 40 мл). При использовании реакторов расчеты велись исходя из объема накопленного газа в перевернутом цилиндре. Концентрации органических кислот определялись на хроматографе «Цвет 800» (детектор - ПИД, газ-носитель - CO₂ при расходе 30 мл/мин),

колонка 1 м x 2 мм, носитель - Chromosorb W/AW-DMCS (Fluka). Температура инжектора - 145°C, детектора – 185°C. Температура колонки поднималась с 80°C до 175°C со скоростью 6°C/мин, и удерживалась 8 минут. Содержание лактата определялось ферментативным методом (Асатиани, 1969). Концентрация БХл *a* измерялась спектрофотометрически при 772 нм после экстракции ацетон-метанольной смесью (Clayton, 1966). Общее содержание сахаров определялось с использованием антронового реагента (Hanson and Phillips, 1984). Концентрацию ионов аммония измеряли микродиффузионным методом (Любимов и др., 1968). Содержание белка оценивали методом Лоури. Соленость среды оценивали по электропроводности, измеренной с помощью кондуктометра (Radelkis ОК-102/1).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Изучено влияние различных концентраций компонентов ферментационных жидкостей и продуктов темновой ферментации на рост и выделение водорода пурпурными несерными бактериями. Определен порядок потребления органических кислот из их смеси.

В экспериментах подтвердилась возможность *Rba. capsulatus* B10 метаболизировать лактат, ацетат, пропионат, бутират для роста и выделения водорода в концентрациях 20-80 мМ. В присутствии 40 мМ изобутирата рост и выделение водорода ингибировались. Добавление 80 мМ любого из субстратов или их смеси (ацетат, лактат, пропионат и бутират по 20 мМ) приводило к 20-30% понижению скорости. Это, по всей видимости, неспецифический эффект, поскольку наблюдается как при добавлении отдельных кислот, так и их смеси.

Добавление 80 мМ пропионата к клеткам, выращенным на лактате, приводило к 70% снижению скорости выделения водорода. Напротив, клетки, выращенные на пропионате, только на 30% ингибировались добавлением 80 мМ пропионата и на 20% добавлением 80 мМ лактата. То есть значительный эффект наблюдался при добавлении пропионата к клеткам, выращенным на лактате, но не наоборот, что свидетельствует о влиянии предыстории культуры.

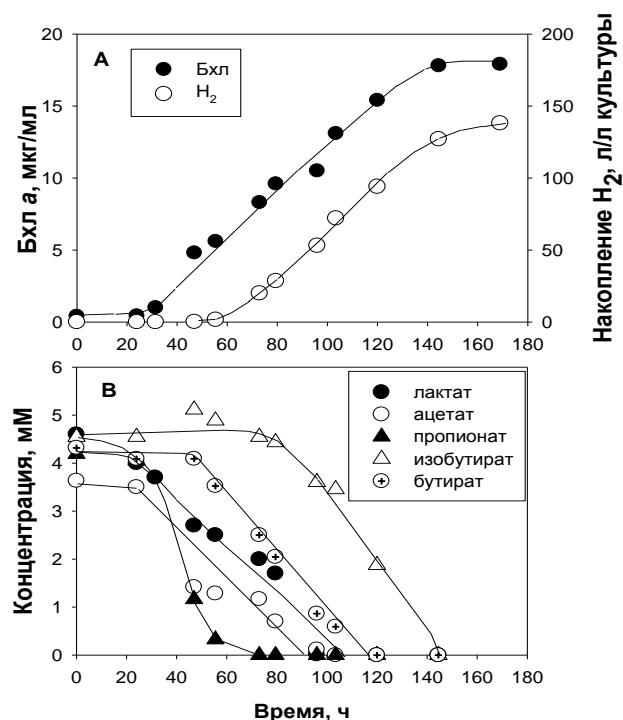


Рисунок 1. Выделение водорода, накопление бактериохлорофилла а и потребление органических кислот *Rba. capsulatus* В10 при росте на эквимольной смеси пропионата, ацетата, лактата, бутирата и изобутирата*.

*Культуры выращивались на среде Ормеруда, содержащей 1 мМ (NH₄)₂SO₄ и пропионат, ацетат, лактат, бутират, изобутират (по 5 мМ).

Показано, что потребление кислот из их эквимольной смеси идет последовательно. Культура потребляла С₄ органические кислоты только после значительного истощения среды по С₂-С₃ органическим кислотам. При этом изобутират использовался последним (рис. 1).

Таблица 1. Влияние добавления различных веществ на рост и кратковременное выделение водорода.

Добавленное вещество	Ингибирование, %	Концентрация добавленного вещества (мМ), вызывающая соответствующее ингибирование роста или выделения водорода	
		Рост	Выделение водорода
Этанол	50	650	1300
Метанол	50	940	1800
Бутанол	50	50	50
Ацетон	0	50	50
Фосфаты	50	120	150
Cu ²⁺	100	0,16	0,16
Zn ²⁺	0	0,31	0,31

^a Культуры выращивались на среде Ормеруда с 20 мМ лактата и 1 мМ (NH₄)₂SO₄.

Среди спиртов наиболее сильным ингибитором оказался бутанол ($K_i = 0,05M$). Этанол и метанол ингибировали рост и скорость выделения водорода при более высоких концентрациях (табл. 1). Ацетон (до 50 мМ) и углекислый газ (до 20 объемных процентов) не влияли на рост и образование водорода.

Фосфаты обычно используются для стабилизации рН при темновой ферментации. На стадии фотоферментации концентрация 150 мМ снижает выход водорода в 2 раза (табл.1). Медь и цинк используются для подавления метаногенеза во время темнового брожения. Клетки *Rba. capsulatus* оказались очень чувствительны к ионам меди, но достаточно устойчивы к ионам цинка (до 0,31 мМ) (табл. 1). Поэтому цинк может быть использован в двухстадийной системе для предотвращения метаногенеза.

2. Разработан комплексный подход для увеличения выхода водорода при использовании продуктов темновой ферментации крахмала, картофеля и барды, включающий оптимальное разбавление ферментационных жидкостей, компенсацию недостающих макроэлементов, увеличение буферной ёмкости среды, снижение светолитирования. Впервые показано, что ферментированная барда может быть использована для получения водорода (12 л/л барды) и биомассы пурпурных несерных бактерий богатой бактериохлорофиллом *a*.

- *Использование продуктов темновой ферментации картофеля.*

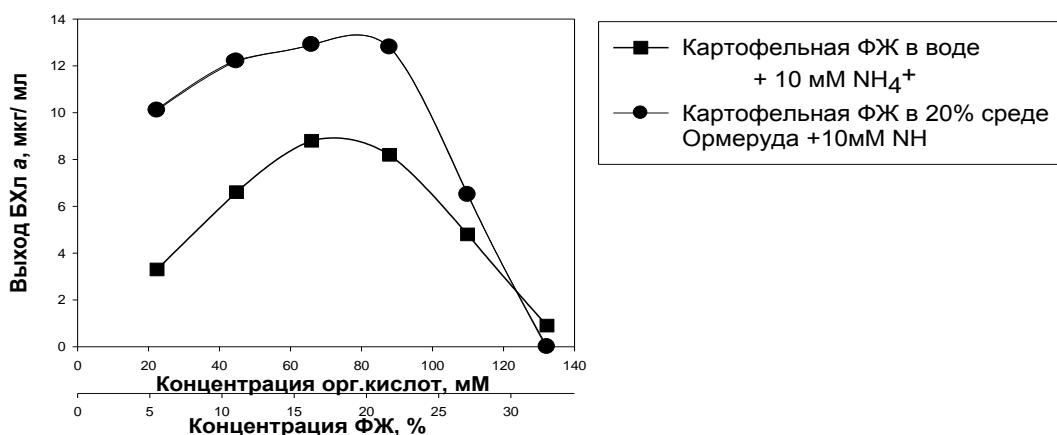


Рисунок 2. Рост *Rba. capsulatus* B10 на различных разведениях картофельной ФЖ в воде и 20% среде Ормеруда.

Показано, что картофельная ФЖ поддерживала рост пурпурных бактерий только при концентрации меньше 30%, т.е. при разведении. Это связано с высоким содержанием органических кислот, которые оказывают ингибирующее действие. Многие исследователи, работающие в данной области, пришли к такому же выводу (Keskin et al., 2011). При концентрации ФЖ менее 15% рост также ограничивался. Такое лимитирование не могло быть связано с нехваткой соединений азота (добавлялось 10 мМ аммония) или органических кислот (20-60 мМ). Лимитирование исчезало при использовании 20% среды Ормеруда для разведения ФЖ (рис. 2). Таким образом, эффект лимитирования был связан с нехваткой неорганических компонентов среды, а именно, как было нами экспериментально показано, Fe^{2+} , Mg^{2+} и фосфатов. Далее все используемые ФЖ дополнялись этими компонентами в концентрациях равных концентрациям в среде Ормеруда.

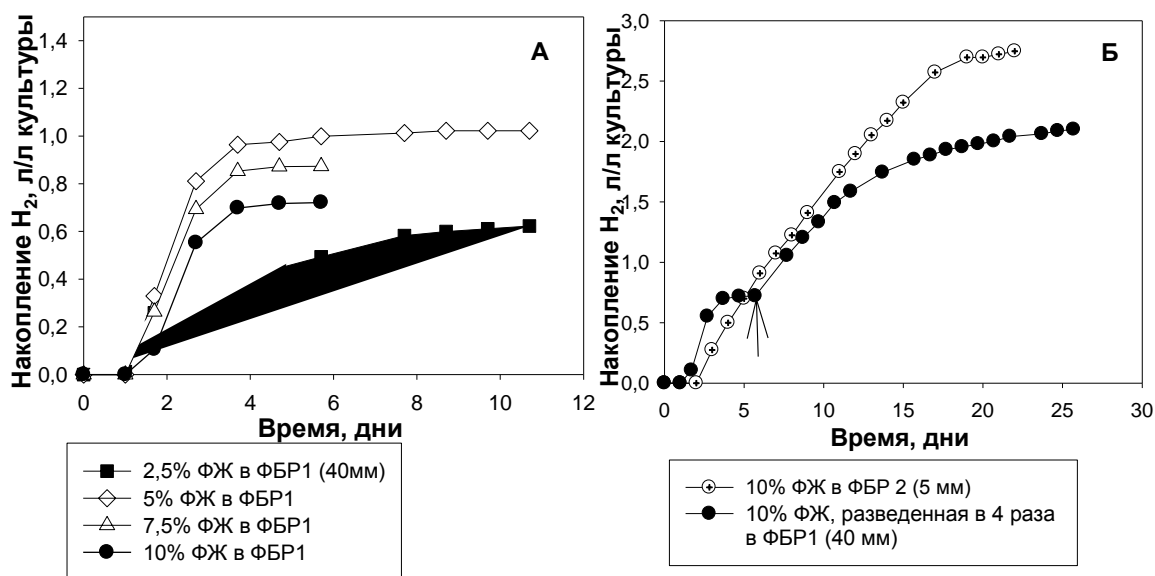


Рисунок 3. Накопление водорода культурой *Rba. capsulatus* V10 при использовании 2,5-10% картофельной ФЖ в ФБР1 (А) и 10% картофельной ФЖ в ФБР2 или ее разведения до 2,5% в ФБР1 (Б). Стрелкой указан момент, когда росшу на 10% ФЖ культуру разводили в 4 раза дистиллированной водой.

Объемный выход водорода в ФБР1 был максимальным при использовании разведенной до 5% картофельной ФЖ – 0,9 л/л культуры. При этом накопление H₂ шло с высокой скоростью, а затем, несмотря на присутствие достаточной концентрации субстратов в среде, останавливалось (рис. 3А). Для 2,5% ФЖ был показан

максимальный приведенный выход водорода – 26,1 л/л 100% ФЖ. Далее при увеличении концентрации ФЖ наблюдалось снижение приведенного выхода водорода (табл. 2).

Для выяснения причин падения приведенного выхода водорода культуру, росшую на 10% ФЖ и прекратившую выделять водород, на 6-й день разводили в 4 раза (рис. 3Б, стрелка). При этом выделение водорода возобновлялось. Значит, остановка процесса могла быть связана с лимитированием культуры светом. Кроме того, с увеличением концентрации ФЖ от 2,5 до 10% приведенный выход водорода снижался (табл. 2), а выход БХл *a*, увеличивался (табл. 2). Применение реактора (ФБР 2) с меньшей толщиной (5 мм) для 10% картофельной ФЖ позволило увеличить приведенный выход водорода с 6,1 до 27,0 л/л ФЖ (табл. 2). Наиболее высокий приведенный выход водорода 40 л/л ФЖ был получен при использовании 5% ФЖ в тонком слое (ФБР2) (табл. 2). Таким образом, эффект самозатенения культуры связан с повышением концентрации доступных источников азота и, соответственно, плотностью культуры. Поэтому применение фотобиореакторов с меньшей длиной светового пути (то есть большим отношением поверхности к объему) повышает выход водорода из более концентрированных ферментационных жидкостей и является одним из решений проблемы самозатенения.

Таблица 2. Выход водорода и накопление БХл *a* *Rba. capsulatus* В10 при использовании 2,5-10% картофельной ФЖ в различных фотобиореакторах¹.

Концентрация ФЖ, %	2,5	5	7,5	10
Выход Н ₂ , л/л культуры	0,65	0,9 2,0 ²	0,7	0,6 2,7 ²
Приведенный выход Н ₂ , л/л ФЖ	26,1	18,6 40,0 ²	9,5	6,1 27,0 ²
Выход БХл <i>a</i> , мг/ л культуры	3,9	4,6	6,1	6,8

1 ФБР1, толщиной 40мм и ФБР2, толщиной 5 мм.

2 Культивирование проводилось в ФБР 2.

Совмещение выделения водорода с очисткой органических отходов позволит сделать процесс выделения водорода рентабельным (Redwood et al., 2009). Поэтому важным показателем использования ФЖ является доля потребления органических субстратов. Кроме того, необходимо учитывать эффективность преобразования субстрата в водород. Этот параметр косвенно показывает, насколько энергетически эффективно выделение водорода данным способом. Опубликованные данные

свидетельствуют, что при фотоферментации может использоваться от 29 до 99% органических кислот (Argun et al., 2008; Lo et al., 2008; Su et al., 2009a,b; Lo et al., 2011).

Количество остаточных органических кислот в среде возрастало при повышении концентрации ФЖ с 2,5 до 10%. При максимальной доле потребления органических кислот (2,5% ФЖ) бутират потреблялся лишь на 58%, а С₃ кислоты – полностью. При 10% концентрации ФЖ бутират практически не потреблялся. Однако можно рассчитывать, что при дальнейшем разведении картофельной ФЖ, когда С₃ кислоты окажутся в недостатке, доля потребления бутирата возрастет. Эффективность преобразования органических кислот в водород снижалась с 64% до 38% при увеличении концентрации ФЖ с 2,5 до 7,5%.

- **Использование отходов спиртовой промышленности (барды).** В России существует проблема утилизации отходов спиртовой промышленности, в то время как они могут стать дешевым субстратом для получения водорода в двухстадийных системах и биомассы ПНСБ богатой БХл *a*. Получение этих продуктов из барды с ее одновременной очисткой актуально и изучалось в данной работе.

Ранее в нашей лаборатории (ИФПБ РАН) было показано, что неферментированная барда (№1) может являться субстратом для роста и выделения водорода *Rba. capsulatus* В10, однако приведенный выход водорода был небольшим (2 л/л барды). Для повышения выхода водорода нами была применена двухстадийная переработка барды. В полученной ферментированной барде было снижено содержание сахаров и пептидов и повышены концентрации органических кислот. Поэтому при фотовыделении водорода не наблюдалось подкисления среды за счет потребления сахаров. Ферментированная барда Б_ф далее использовалась в качестве субстрата, используемого ПНСБ для выделения водорода.

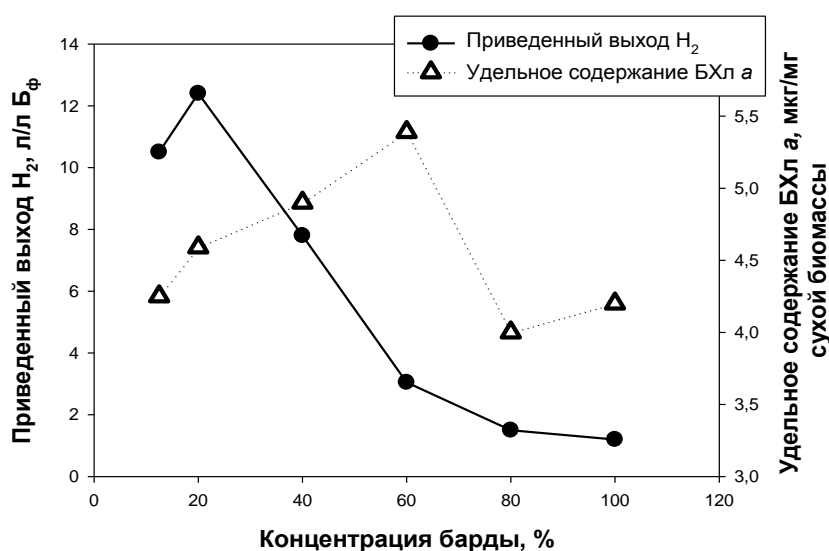
Эксперименты с периодической культурой *Rba. sphaeroides* №7 показали, что необходимо разведение ферментированной барды, а внесение фосфатов и солей Mg и Fe в 20% Б_ф увеличивает приведенный выход водорода и удельное содержание БХл *a*.

Приведенный выход водорода был максимальным (12,0 л/л Б_ф) при применении 20% Б_ф (рис. 4). При концентрации Б_ф 60-80% выделение водорода существенно ингибировалось. Однако суммарная концентрация органических кислот в 60% Б_ф №2 составляет 67 мМ, что не должно вызвать такого ингибирования. При этом удельное содержание БХл *a* (БХл *a*/вес сухой биомассы) резко возрастало (рис. 4). Поэтому,

ингибирование выделения H_2 связано с высокой плотностью культуры, что приводит к эффекту самозатенения, как описано ранее.

При выборе оптимального разведения барды для получения водорода необходимо учитывать и долю потребления субстратов. Остаточные сахара потреблялись полностью при любых исследованных концентрациях B_{ϕ} . При концентрациях B_{ϕ} 20-40% наблюдалось практически полное поглощение органических кислот, а при дальнейшем увеличении концентрации B_{ϕ} доля потребления кислот снижалась. Это коррелирует со снижением выделения водорода, обусловленным лимитированием культуры светом (рис. 4).

Рисунок 4. Выход водорода и удельное содержание бактериохлорофилла а при использовании различных разведений ферментированной барды №2 *Rba. sphaeroides* №7.



Максимальная эффективность преобразования органических кислот в водород достигала 60% (при 20% B_{ϕ}) и была близка к эффективности, полученной при использовании 2,5% картофельной ФЖ (64%). Далее при увеличении концентраций B_{ϕ} эффективность преобразования кислот в водород снижалась.

3. Подобрана новая матрица для иммобилизации пурпурных несерных бактерий и отработана простая и дешевая методика их иммобилизации. Изучено выделение водорода и очистка картофельных, крахмальных ферментационных жидкостей, а также барды в непрерывном режиме в фотобиореакторе.

• **Методика иммобилизации.** В связи с тем, что максимальные скорости выделения водорода были получены при использовании дорогостоящего пористого стекла (Tsygankov, 2003;2004), было предложено использовать стеклоткань в качестве матрицы. Стеклоткань характеризуется всеми преимуществами пористого стекла (прозрачна, механически устойчива, обладает высоким отношением поверхности к объему), но гораздо дешевле. Для увеличения эффективности и скорости иммобилизации подбиралась оптимальная обработка стеклоткани. Обработку таким дорогим реагентом, как аminosилан, заменили обработкой щелочью, так как скорости иммобилизации клеток были сравнимы.

Стеклоткань стерилизовали непосредственно в реакторе, куда затем подавалась среда Ормеруда (5 мМ глутамата и 15 мМ лактата) с инокулятом (15%). Иммобилизация в реакторе для иммобилизованной культуры (имм-ФБР) продолжалась всего 2 суток. До этого существовал метод, когда иммобилизация цианобактерий и микроводорослей проводилась в отдельном сосуде в течение 2-3 недель, а затем матрица переносилась в ФБР (Laurinavichene et al., 2006; Serebryakova, Tsygankov, 2007), что повышало риск заражения и снижало активность клеток, из-за взаимодействия с кислородом воздуха.

Таблица 3. Скорости выделения водорода иммобилизованной культурой при использовании искусственных сред.

Состав среды		Скорость выделения водорода, %
Органические кислоты	Соединения азота	
Лактат 15мМ ^б	Глутамат 0,1мМ ^б	100 ^а
Ацетат 15-30-40-60-80мМ	Глутамат 0,1мМ	96 ± 9
Лактат 15 мМ	NH ₄ ⁺ 0,2-0,5-1,0мМ	99 ± 7
Лактат 15 мМ	NH ₄ ⁺ 2,0мМ	36 ± 26 ^в
Лактат 15 мМ	Пептон 0,1%	133 ± 11

^а Контрольная скорость выделения H₂ (принято за 100 %) измерялась непосредственно до указанного эксперимента и составляла в среднем 5,1 мл/ч/имм-ФБР,

^б Стандартная среда,

^в Скорость выделения водорода снижалась в течение дня.

Скорость выделения водорода на среде с 15 мМ лактата и 0,1 мМ глутамата в среднем составляла 4-6 мл/ч/имм-ФБР (контрольная скорость, 100%) и поддерживалась в течение 3 месяцев. Кроме того, иммобилизованная культура в проточном ФБР была более устойчива к повышенным концентрациям ацетата (до 80 мМ включительно) и

аммония (до 2 мМ). Использование пептона повышало скорость выделения водорода (табл. 3).

- **Использование крахмальной ФЖ.** В имм-ФБР использовались 2 образца крахмальных ФЖ, которые отличались концентрацией крахмала в среде для темного брожения (5 или 30 г/л среды) и, следовательно, суммарной концентрацией органических кислот (27,2 мМ и 250 мМ). ФЖ1 (5 г/л крахмала) использовалась без разведения. При этом фотовыделение водорода шло со скоростью близкой к контрольной (рис. 5Б). Несмотря на разведение ФЖ2 в 10 раз, скорость выделения водорода снижалась в течение 2 дней (рис. 5А). Среда Ормеруда с концентрацией кислот в 2 раза меньшей, чем в 10% ФЖ2, напротив поддерживала скорость выделения водорода (рис. 5А). Можно предположить, что падение скорости в случае 10% ФЖ2 обусловлено недостатком компонентов среды. Действительно, при добавлении ионов железа, магния и фосфатов в 10% ФЖ2 скорость выделения водорода восстанавливалась (рис. 5Б).

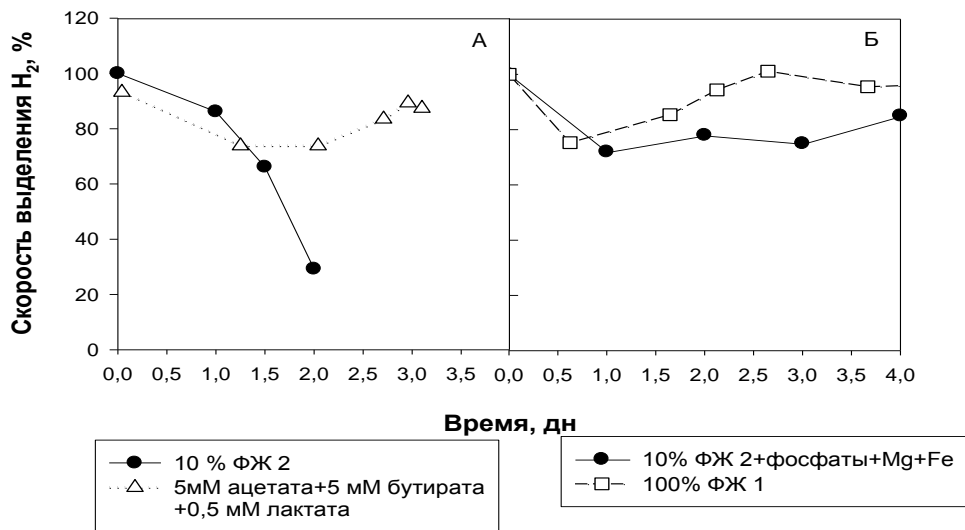


Рисунок 5. Скорость выделения водорода при использовании 10% ФЖ2 в зависимости от добавления фосфатов, магния и железа и в сравнении со средой Ормеруда и 100% ФЖ1.

- **Использование картофельной ФЖ.** Для выделения водорода было необходимо разбавление ФЖ. Картофельную ФЖ (400 г картофеля/л в среде для темновой ферментации) разводили до 0,5–10% и добавляли соли магния, железа, фосфаты. Скорость выделения H_2 повышалась с ростом концентрации картофельной ФЖ до 1,25-

2,5%, а при дальнейшем увеличении до 10% не изменялась, то есть концентрация 1,25-2,5% была минимальной насыщающей. Приведенный выход H_2 составлял около 30 л/л ФЖ. Максимальная эффективность преобразования органических кислот в водород составляла 65-70% и наблюдалась при использовании 0,75–1,25% ФЖ, что коррелировало и с полнотой использования органических кислот: более 60 % для лактата и бутирата, 100 % для ацетата.

- **Использование барды.** Оптимальные концентрации неферментированной барды, при которых скорость выделения H_2 была 90% от контрольной, составляли 10-20%. Увеличение концентрации барды до 50% приводило к снижению скорости до 62% от контрольной. Это можно объяснить снижением рН среды в ФБР до 5,9-6,2. Доведение начального рН до 8,4 и увеличение концентрации фосфатов не стабилизировало скорость. Снижение рН является косвенным подтверждением использования сахаров. Кроме того, при высоких концентрациях барды наблюдался обильный рост клеток не только на матрице, но и в суспензии, из-за высокого содержания аммония (2,8 г/л). Из 5-10% барды потреблялось 40-70% сахаров, при этом лактат утилизировался полностью. Доля утилизации пептидов не превышала 30%.

- **Способы улучшения очистки ФЖ от органических кислот.** Вышеприведенные исследования показали, что за пределами оптимального (достаточно узкого) диапазона разбавлений либо снижается скорость выделения H_2 (при полном использовании орг. кислот), либо снижается доля утилизации субстратов. Методами повышения доли потребления субстратов из ФЖ может быть повторное использование вытекающей среды. Повторное использование 5% картофельной ФЖ позволило увеличить долю потребления ацетата с 58 до 100%, лактата с 18 до 54% и бутирата с 1 до 9%. При этом скорость выделения водорода при вторичном использовании 5% ФЖ не снижалась.

4. Оценена эффективность двухстадийной системы получения водорода.

Общепринятыми показателями эффективности способов получения водорода является молярный выход водорода (Redwood et al., 2009).

- **из картофельного гомогената.**

При использовании картофельного гомогената в темновой стадии выход водорода составил 0,7- 0,9 моль/моль гексозы. Молярный выход водорода рассчитывался с

учетом исходного количества крахмала в картофельном гомогенате 15 г или 83,3 ммоль гексозы/100г картофеля. Выход H_2 при фотоферментации картофельной ФЖ достигал 4,9 моль/моль гексозы (табл. 4) или 61% от теоретически возможного. Это превышает ранее полученные показатели 1,2 – 4,6 моль/ моль гексозы (Yokoi et al., 1998; Yokoi et al., 2001; Lo et al., 2008; Su et al., 2009a; Ozgur et al., 2010a) при использовании крахмальных ФЖ. При повышении концентрации ФЖ (2,5-7,5%) выход H_2 снижается из-за лимитирования светом. В реакторах с меньшей толщиной слоя (5 мм) выход водорода был выше (табл. 4).

Таблица 4. Эффективность двухстадийной системы получения водорода из картофельного гомогената (400 г/ л) в зависимости от концентрации ферментационной жидкости и толщины фотобиореактора.

Фотоферментация		Интегрированная система	
Концентрация ФЖ, %	Выход H_2 , моль/моль гексозы	Суммарный выход H_2 , моль/ моль гексозы ¹	% от теор. возможного
2,5	4,1	4,8	40
5	2,9	3,6	30
	4,9 ²	5,6 ²	47 ²
7,5	1,3	2,0	17
10	0,9	1,6	13
	3,3 ²	4,0 ²	33 ²

¹ Выход темнового процесса составлял 0,7 моль H_2 / моль глюкозы

² Культивирование ПНСБ проводилось в тонкослойном ФБР (толщиной 5мм).

Суммарный молярный выход водорода в интегрированной системе с использованием картофельного гомогената суспензионной культурой *Rba. capsulatus* В10 достигал 5,6 моль/моль гексозы, что составляет 47% от теоретически возможного (табл. 4). Выход водорода при использовании иммобилизованной культурой *Rba. sphaeoides* GL 0,75-1,25% ФЖ составлял около 30 л/л картофельной ФЖ или 3,8 моль H_2 /моль гексозы, а суммарный выход в двухстадийной системе - 4,7 моль/моль гексозы. Проточный режим и иммобилизация клеток позволяет повысить скорость процесса.

- **из барды.** Приведенный выход водорода при фотоферментации 5% барды составлял 2,0 л/л барды (суспензионная культура) или 3,2 л/л (иммобилизованная культура) (табл. 5). При этом теоретически из органических кислот, содержащихся в барде, возможно было получить только 3,1 л H_2 /л барды.

Предварительная обработка барды в первой стадии интегрированного процесса позволила повысить теоретический выход водорода в фотостадии до 12,6 л/л Б_ф№1 (или 21,1 Б_ф№2) из-за увеличения концентрации органических кислот (табл. 5). Приведенный выход водорода возрос с 2-3,2 л/л Б_ф№1 до 6,5 л/л Б_ф№1 и 12,0 л/л Б_ф№ 2 (табл.5). Кроме того, темновое сбраживание позволило избежать закисления среды при потреблении сахаров ПНСБ, снизить концентрации азотистых соединений, а также увеличить суммарную концентрацию органических кислот. Таким образом, начальный субстрат (барда) стал использоваться более эффективно. Суммарный выход водорода в двухстадийной системе составил 13,6 л/л барды №2, наибольший вклад в который вносила стадия фотоферментации.

Таблица 5. Эффективность выделения водорода с использованием ферментированной и неферментированной барды.

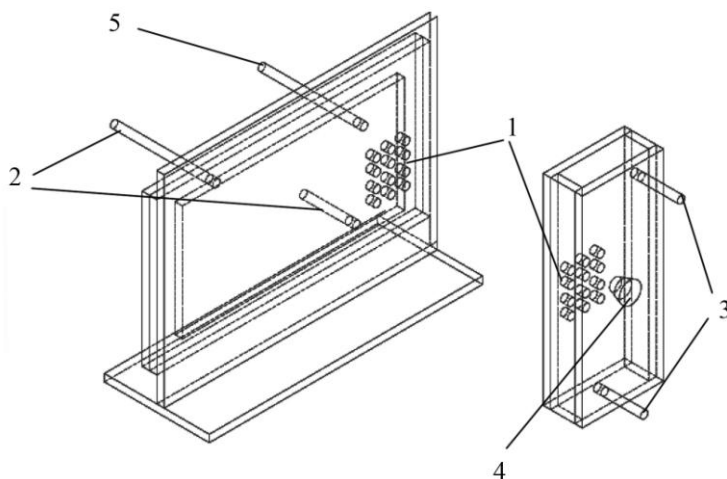
Субстрат	Барда №1 (5%)		Б _ф 1 (5%)	Б _ф 2 (20%)
	Суспензия <i>Rba.caps.V10</i>	Имм-ФБР <i>Rba. sph.GL</i>	Суспензия <i>Rba. caps.V10</i>	Суспензия <i>Rba.sph. №7</i>
Теоретически возможный выход Н ₂ из орг. кислот в фотостадии, л/л барды	3,1		12,6	21,1
Приведенный выход Н ₂ в фотостадии, л/л барды	2,0	3,2	6,5	12,0
Эффективность выделения водорода в фотостадии, %	65	103	52	58
Общий выход Н ₂ , л/л барды	<i>a</i>	<i>a</i>	8,1	13,6

a - темнового сбраживания не проводилось.

5. Разработан и испытан новый тип реактора, в котором обе стадии двухстадийной системы пространственно объединены.

Объединение брожения и фотоферментации в комбинированном реакторе должно приводить к сокращению времени преобразования субстратов в водород, а также исключить стадию подготовки ферментационной жидкости перед подачей в световой реактор. Поэтому был разработан новый тип реактора для объединения процессов. При равном объеме (76 мл) отсеки совмещенного реактора имеют разные пространственные размеры: темновой реактор – 95x20x40 мм; световой реактор – 95x4x200 мм. Таким образом, световой реактор имеет маленькую толщину (4 мм), то есть отношение освещаемой поверхности к объему составляет 0,2 единицы. Это значение выше, чем у других описанных ФБР (Цыганков, 2000). Поэтому самозатенение культур будет

наблюдаться при больших концентрациях клеток. Для обмена продуктами темновой стадии, которые являются субстратами для световой стадии, предусмотрены отверстия – диффузионные контакты (1; рис.6) и диализная мембрана, которая пропускает все компоненты среды, но препятствует проникновению клеток, спор, а также крахмала. Однако из-за сосуществования культур в одних условиях и одной среде требуется создание компромиссных условий.



1. Отверстия для диффузионного контакта,
2. Вводной и выводной штуцеры светового реактора,
3. Вводной и выводной штуцеры темнового реактора,
4. Пробоотборник,
5. Штуцер для отвода газа

Рисунок 6. Конструкция комбинированного реактора для двухстадийной системы.

В изолированной световой ячейке при использовании модельной среды с 33 мМ бутирата фотовыделение водорода достигало 1,8 л/л. Эффективность преобразования бутирата в H_2 составляла лишь 21%, хотя бутират потреблялся полностью (и в случае *Rba. capsulatus* В10, и в случае *Rba. sphaeroides* №7). Возможно, некоторый фактор снижал выход водорода в этой ячейке, например, направляя расход бутирата на дыхание или синтез полигидроксибутирата (попадание воздуха, высокая интенсивность света), также влияя на воспроизводимость результатов.

Присоединение темновой части (через мембрану, но без темновых бактерий) и заполнение обеих частей модельной средой с ацетатом (15 мМ) и бутиратом (20 мМ) обеспечило фотовыделение водорода (3 л/л) при эффективности преобразования органических кислот в водород до 35-38% от теоретически возможной. При этом

ацетат и в световом, и в темновом реакторе потреблялся практически полностью, а бутират – лишь на 50-75%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Использование разных органических субстратов в составе синтетических сред чистыми культурами ПНСБ изучалось очень подробно (Кондратьева, 1996). Перспектива применения ПНСБ в двухстадийных системах получения водорода с использованием органических отходов с их одновременной очисткой дала новый толчок исследованиям. Особенность такого подхода заключается в том, что для роста и выделения водорода ПНСБ должны использовать продукты темнового брожения (ФЖ). ФЖ более сложны по составу, чем синтетические среды, так как содержат не только органические кислоты (обычные продукты темновой ферментации), но и компоненты сред темновой стадии, вещества, содержащиеся в исходном природном субстрате, и специально добавленные ингибиторы метаногенеза или рН-стабилизирующие агенты и, возможно, другие неидентифицированные соединения.

Для фотоферментации в нашей работе использовались синтетические среды с органическими кислотами, затем - продукты темновой ферментации крахмала, далее картофеля, и наконец – промышленные отходы производства спирта. Эксперименты проводились как с суспензионными периодическими культурами, так и с непрерывными иммобилизованными культурами. Полученные результаты оценивались комплексно с точки зрения разных параметров процесса: скорость выделения H_2 ; эффективность преобразования органических кислот в водород; доля потребления органических кислот (степень очистки); молярный выход водорода; приведенный выход водорода (в расчете на исходный неразбавленный субстрат); эффективность выделения H_2 в двухстадийном процессе; выход БХЛ *a*.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод об основных факторах, которые важны при использовании ФЖ для получения водорода на второй стадии интегрированного процесса. Этими факторами являются суммарная концентрация органических кислот, концентрация азотсодержащих веществ, дефицит микро- или макроэлементов, светолимитирование.

Поскольку продукты темновой ферментации содержат обычно высокие концентрации органических кислот (картофельная ФЖ содержала 468 мМ орг. кислот, а крахмальная ФЖ2 – 250 мМ), а ингибирующие концентрации органических кислот

составляют около 80 мМ, очевидна необходимость разведения ферментационных жидкостей.

Использование разбавления ФЖ перед фотоферментацией имеет и негативные последствия. Прежде всего, разбавление может привести к возникновению дефицита каких-либо микро- или макроэлементов. Критическими компонентами среды в нашем случае оказались ионы магния и железа. Очевидно, что набор таких добавок определяется составом исходного субстрата, среды для темновой ферментации и необходимой степенью ее разбавления. Положительный эффект добавления фосфатов связан с их буферным эффектом, то есть поддержанием допустимых значений рН.

В состав ферментационных жидкостей могут входить ионы аммония и другие азотсодержащие вещества. Высокая концентрация азотсодержащих веществ может ингибировать выделение H_2 (выключая нитрогеназу) в непрерывном процессе, как было показано для имм-ФБР при концентрации аммония 2 мМ (табл. 3). В периодическом процессе высокая концентрация азотсодержащих веществ обуславливает рост бактерий и высокую плотность культуры, что, как правило, приводит к самозатенению культуры и подавлению выделения водорода. Этот эффект был показан для картофельной ФЖ, где как разбавление ФЖ от 10% до 2,5%, так и уменьшение толщины слоя культуры до 5 мм в ФБР2 увеличивало выход H_2 (рис. 5).

Считается, что иммобилизация повышает устойчивость ПНСБ к разным факторам среды (Miitsu et al., 1985; Zhu et al., 1999; Zhang et al., 2008; Liu et al., 2011). В наших экспериментах добавление к суспензии клеток 80 мМ орг. кислот (или их смеси) уже вызывало 20-30% ингибирование. В случае имм-ФБР содержание 80 мМ ацетат на входе не снижало скорости выделения H_2 (табл. 3).

В экспериментах с имм-ФБР, по-видимому, улучшенное снабжение светом при достаточно высокой концентрации биомассы (15 мкг БХл *a*/ см² матрицы в начале культивирования) обусловило более высокую скорость продолжительного выделения водорода при использовании 5 % картофельной ФЖ, а именно около 3,5 л/л/ день по сравнению с максимальной скоростью 0,2-0,45 л/л/день в периодической суспензионной культуре. Однако для практического применения иммобилизованной культуры необходимо использовать дешевую матрицу и быструю простую процедуру иммобилизации. Всем этим требованиям удовлетворяет стеклоткань, предложенный способ ее активации и схема иммобилизации. В случае кратковременного (1-2 дня)

снижения скорости выделения H_2 (при испытании неоптимальных сред), характеристики процесса быстро восстанавливались после замены среды на стандартную. В целом время непрерывной стабильной работы реактора достигало 3 месяцев.

Производство биоводорода может быть рентабельным только при использовании органических отходов в качестве субстратов и их одновременной очистке (Redwod et al., 2009; Uyar et al., 2012). Нами показано, что применение двухстадийной системы, где вначале происходит сбраживание барды анаэробным гетеротрофным консорциумом, повышает эффективность использования субстратов для производства водорода и улучшает очистку барды. Темновое сбраживание обеспечивает гидролиз остаточных сахаров барды до органических кислот с частичным использованием азотсодержащих соединений. В этом случае приведенный выход водорода увеличивается с 2,0 л/л (только фотоферментация) до 13,6 л/л (1,6 л/л (темновая ферментация) + 12,0 л/л (фотоферментация)).

Выясненные особенности потребления ПНСБ органических кислот из их смесей позволяют предположить, что в случае насыщающей (избыточной) суммарной концентрации доля потребления бутирата (изобутирата) будет минимальной, так как именно C_4 органические кислоты потребляются в последнюю очередь (по крайней мере *Rba.capsulatus* B10, а также другими штаммами, позднее проверенными в лаборатории) (Khusnutdinova et al., 2012). Эта особенность, видимо, обуславливает пониженную эффективность выделения H_2 от теоретически возможного, так как по стехиометрическим соотношениям наибольший молярный выход H_2 (10 моль/моль орг. кислоты) может быть достигнут при использовании бутирата.

Таким образом, разработанный и использованный подход позволил подобрать режим, обеспечивающий высокий выход водорода и/или достаточно полную очистку ФЖ от органических кислот. Этот подход, заключающийся в анализе состава ФЖ и необходимой его коррекции, учитывающей физиологические особенности конкретного штамма и использующий ФБР с высоким отношением поверхности к объему, можно рекомендовать и при подборе условий для максимального выделения водорода в других исследованиях и при практическом применении.

ВЫВОДЫ:

1. Показана перспективность применения пурпурных несерных бактерий в интегрированных системах получения водорода с одновременной очисткой органических отходов.

2. Разработан комплексный подход для повышения выхода водорода за счет пурпурных несерных бактерий во второй стадии интегрированной системы, перерабатывающей крахмал, картофель и барду. Он включает определение максимально допустимых концентраций компонентов ферментационных жидкостей, их разведение, дополнение макроэлементами, увеличение буферной ёмкости, снижение светолIMITИРОВАНИЯ.

3. Впервые для иммобилизации пурпурных несерных бактерий применена стеклоткань. Выделение водорода в фотобиореакторе было стабильным в непрерывном режиме.

4. Впервые показано, что ферментированная барда может быть использована пурпурными несерными бактериями для выделения водорода с выходом 12 л/л и эффективностью преобразования органических кислот в водород до 65%.

5. Впервые обнаружено, что в синтетических средах и в реальных ферментационных жидкостях как суспензионные, так и иммобилизованные культуры используют в первую очередь C₂-C₃ кислоты.

6. Разработан и изготовлен макет нового типа реактора, в котором обе стадии интегрированного процесса объединены. Проведены испытания первой и второй стадии интегрированного процесса отдельно.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Laurinavichene T.V., Tekucheva D.N., Laurinavichus K.S., Ghirardi M., Seibert M., Tsygankov A.A. (2008) Towards the integration of dark and photo fermentative waste treatment. 1. Hydrogen photoproduction by purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* using potential products of starch fermentation. Int J Hydrogen Energy, **33**(23),7020 - 7026.

2. Laurinavichene T.V., Belokopytov B.F., Laurinavichus K.S., Tekucheva D.N., Ghirardi M.L., Seibert M., Tsygankov A. A. (2010) Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 3. Potato as substrate for sequential dark fermentation and light-driven H₂ production. Int J Hydrogen Energy. **25**(16), 8536-8543.

3. Tekucheva D.N., Laurinavichene T. V., Seibert M., Tsygankov A.A. (2011). Immobilized purple bacteria for light-driven H₂ production from starch and potato fermentation effluents. Biotechnol Prog, - **27**(5), 1248-1256.

4. Tsygankov A.A., Tekucheva D.N. (2012) Integration of biological H₂ producing Processes. In: State of the art and progress in production of biohydrogen, Levin D., Azbar U. (eds.) Bentham Science Publishers, pp. 78-94.

5. Текучева Д.Н., Цыганков А.А. Сопряженные биологические системы получения водорода (Обзор) Прикл. биохимия и микробиология, - **48**(4).

Тезисы конференций:

1. Текучева Д.Н., Лауринавичене Т.В., Цыганков А.А. (2008) Получение биоводорода с использованием органических сточных вод. В сб: Возобновляемые источники энергии: сборник трудов по материалам научной молодежной школы с международным участием, под ред. А.А. Соловьева. М.: Университетская книга, Ч.2., С.84 - 90.

2. Текучева Д.Н., Лауринавичене Т.В., Цыганков А.А. Применение иммобилизованных бактерий в проточном биореакторе для получения водорода с использованием крахмалсодержащих отходов. Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: симпозиум с международным участием, под ред. А.И. Нетрусова, Н.И. Колотиловой. – Москва, 2009. – С. 216.

3. Текучева Д.Н., Лауринавичене Т.В., Цыганков А.А. Выделение водорода *Rhodobacter capsulatus* В10 с использованием сброженного крахмалсодержащего сырья. Автотрофные микроорганизмы: Всероссийский симпозиум с международным участием: Материалы, под ред.: А.И. Нетрусова, Н.И. Колотиловой. – Москва, 2010. – С. -128.

4. Tekucheva D.N., Laurinavichene T.V. and Tsygankov A.A. Hydrogen photoproduction by *Rhodobacter capsulatus* В10 using by-products of starch-containing wastes fermentation. Тезисы докладов Международной конференции «Преобразование энергии света при фотосинтезе». – Москва, 2008. - С. 109.

5. Tsygankov A., Tekucheva D., Laurinavichene T., Ghirardi M., Seibert M. Hydrogen photoproduction by immobilized purple bacteria using artificial and real fermentation broth. Abstracts of International conference and training workshop on molecular/nano-photochemistry, photocatalysis and solar energy conversion. – Egypt, Cairo: Sabry Corp LTD. - 2008. - P.49-50.

6. Tekucheva D., Laurinavichene T., Ghirardi M., Seibert M., Tsygankov A. Hydrogen photoproduction by suspension or immobilized purple bacterial cultures using products of dark fermentation of starch and potato. Abstracts of 13th international symposium on phototrophic prokaryotes. – Montreal, Canada, 2009, P. 108-109.

7. Tekucheva D., Laurinavichene T., Sribert M., Tsygankov A. Hydrogen production from starch fermentative effluents and distillery dregs using immobilized *Rhodobacter sphaeroides* GL. The 9th International Hydrogenase Conference: The Book of Abstracts. – Uppsala, Sweden, 2010. - P. 138.

8. Текучева Д.Н., Лауринавичене Т.В., Цыганков А.А. Выделение водорода из крахмалсодержащих отходов в совмещенной биосистеме с использованием иммобилизованной пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* GL. «Биология – наука 21 века»: 14-я международная школа-конференция молодых ученых. - Пушино, 2010. – С. 339-340.

Список сокращений.

Б_ф – ферментированная барда

БХл *a* – бактериохлорофилл *a*

Имм-ФБР – фотобиореактор с иммобилизованной культурой

ПНСБ – пурпурные несерные бактерии

ФЖ – ферментационная жидкость

ФБР – фотобиореактор.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. А.А. Цыганкову. Глубокую благодарность и признательность за неоценимый вклад в проделанную работу к.б.н. Т.В. Лауринавичене, В.Е. Букатину, Ю.В. Сениной, к.б.н. Б.Ф. Белокопытову, к.б.н. К.С. Лауринавичусу, а также всем сотрудникам лаборатории БФФО ИФПБ РАН за неоценимую помощь и личную поддержку в работе над диссертацией.