

Абрамов
Сергей Маркович

Микробная конверсия целлюлозосодержащих отходов в электроэнергию с помощью
водородного электрода, интегрированного в среду ферментации

03.02.03 - Микробиология

03.01.06 - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Нетрусов Александр Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Ножевникова Алла Николаевна

кандидат химических наук
Скляр Владимир Ильич

Ведущая организация: Институт биохимической физики
имени Н.М.Эмануэля, г.Москва

Защита состоится « 4 » октября 2011 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корпус 12, биологический факультет, аудитория М-1

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

Автореферат разослан « 2 » сентября 2011 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Пискунова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Развитие методов переработки органических отходов и поиск новых перспективных энергоносителей – одни из основных задач стоящих перед современным обществом.

Эффективная переработка органического сырья (в том числе отходов деревообрабатывающей, пищевой, сельскохозяйственной промышленности, муниципальных отходов) - чрезвычайно сложная научно-техническая и социально-экономическая задача. Утилизация отходов путем захоронения на свалках, рециклинга и сжигания повышает удельную нагрузку на почву, приводит к сокращению природных площадей, значительному загрязнению окружающей среды токсичными веществами и невозможности обеспечить окупаемость экологических мероприятий. Несмотря на это количество отходов, антропогенного происхождения, постоянно увеличивается.

Усилия современных исследователей сосредоточены на решении задачи, переработки широкого спектра отходов в целом и органических отходов в частности. Целлюлозосодержащее сырьё занимает здесь особое место, поскольку представляет собой субстрат тяжёлый для биодеструкции. Многие микроорганизмы всё же способны вполне активно гидролизовать целлюлозу. В тоже время одним из основных продуктов микробной переработки целлюлозы является водород. Водород можно использовать в качестве топлива, так например теплота сгорания водорода в несколько раз превышает теплоту сгорания бензина. Примерно половина водорода, производимого в мире сегодня, извлекается из природного газа в ходе его переработки, методом парового риформинга (Padro et al.,1999). Этот метод имеет два недостатка. Во-первых, в качестве побочного продукта выделяется углекислый газ, загрязняющий атмосферу и, во-вторых, сырьё для производства водорода является исчерпаемым ресурсом. Поэтому развитие технологий получения микробного водорода носит первостепенный характер в секторе биотопливной энергетики. Однако на сегодняшний день, пока ещё не существует ни одной коммерчески эффективной технологии производства водорода из возобновляемого сырья. До сих пор не решены проблемы хранения, транспортировки и очистки водорода.

Большинство этих проблем можно было бы решить путём использования технологии водород-кислородных топливных элементов (ТЭ). Окисление водорода в ТЭ происходит на платиновом катализаторе. Платина, в свою очередь, необратимо ингибируется серосодержащими соединениями, которые в значительной степени присутствуют в водороде микробиологического происхождения.

Группой учёных химического факультета МГУ был разработан водородный электрод, который осуществляет реакцию окисления водорода с помощью фермента

гидрогеназы иммобилизованной на графитовом носителе (Morozov et al., 2002). Применение этой технологии для конструирования водород-кислородных ТЭ работающих в среде ферментации микроорганизмов позволило бы в значительной степени продвинуться на пути развития водородной энергетики.

Исследования проведены при финансовой поддержке федеральной целевой программы Министерства образования и науки Российской Федерации «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 годы в рамках реализации проекта «Проведение поисковых научно-исследовательских работ по направлению «Производство топлив и энергии из органического сырья» ГК № 558, а также при поддержке европейского гранта FP6 «HYVOLUTION» SES-6 019825.

Цель работы. Микробная переработка целлюлозосодержащих отходов в электроэнергию через промежуточное образование водорода с использованием ферментного электрода, погружённого в среду ферментации.

Достижение данной цели предполагало решение следующих задач:

- выделение и отбор анаэробных термофильных целлюлозолитических водородобразующих сообществ микроорганизмов из природных биотопов;
- оптимизация условий культивирования отобранных сообществ микроорганизмов;
- определение таксономического состава отобранных сообществ микроорганизмов;
- изучение электрохимических характеристик ферментного электрода в среде ферментации;
- разработка технологии переработки целлюлозосодержащих отходов в электроэнергию.

Научная новизна.

В работе:

- впервые было предложено использование ферментного электрода на основе гидрогеназы для окисления водорода, выделяемого термофильным целлюлозолитическим сообществом микроорганизмов;
- впервые была создана установка, предназначенная для переработки целлюлозы анаэробными термофильными микроорганизмами в электроэнергию.

Практическая значимость работы.

Полученные в рамках проведённых исследований результаты, могут быть применены в дальнейшем для разработки промышленных установок предназначенных для

переработки органических отходов в топливный водород, который может быть окислен непосредственно в среде ферментации с образованием электроэнергии, в системе ферментного ТЭ.

Предложенная в работе технология биореакторного ТЭ может найти широкое применение для производства электроэнергии в процессе микробной утилизации органических отходов.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на международных научных конференциях: Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2009 г.), 11-ой научной конференции «Экосистемы, организмы, инновации - 11» (Москва, 2009 г.), 3-ей международной конференции «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2009 г.), 5-ом Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009 г.), международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов» (Москва, 2010 г.), международных конференциях EurAsiaBio-2010 (Москва, 2010 г.), «Permea-2010» (Словакия, 2010 г.), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2010 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 3 статьи в рецензируемых журналах, 3 из которых – в журналах, рекомендованных ВАК, 8 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (214 литературных источников, из которых 31 отечественный и 183 иностранных). Работа изложена на 136 страницах, содержит 5 таблиц и 53 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов. Целлюлозолитические водородобразующие сообщества выделяли из различных биотопов, в которых теоретически и визуально происходил процесс разложения целлюлозы. Были отобраны образцы из следующих ниш: налет на растениях приболоченной части пресноводного водоема, ил закрытого пресного водоема,

разложившиеся образцы камыша (прикорневая часть, корни), опад полуразложившейся листвы из лесного водоема, содержимое кишечника различных видов тараканов (американского, мадагаскарского, черного, туркестанского), содержимое кишечника термитов, дождевой червь (целиком, включая содержимое кишечника), образцы компостированного жома красного и белого винограда (из различных резервуаров винодельческого завода), образцы экскрементов антилопы гну, зебры, жирафа, черной антилопы, пони, слона, смешанные пробы экскрементов коров. Кроме того исследовали образцы содержимого горячих гейзеров из Долины гейзеров на полуострове Камчатка и из горячих гейзеров на острове Исландия. Пробы отбирали из ниш характеризующихся различными температурными условиями. Отбор проб производили в стерильные герметичные пластиковые флаконы. Всего было отобрано более 50-ти образцов.

Культивирование микроорганизмов. Выделение сообществ и чистых культур водородобразующих целлюлозолитиков проводили на среде Имшенецкого следующего состава (г/л): NaNH_4PO_4 - 1,5; K_2HPO_4 - 0,5; KH_2PO_4 - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4; NaCl - 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - следы; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - следы; CaCO_3 - 2,0; пептон - 5,0. pH среды - 7,0 - 7,2 до стерилизации.

Изолированные колонии целлюлозолитиков получали, выращивая культуры в толще агаризованной среды в трубках Бурри и в чашках Петри, помещая последние в анаэробный эксикатор. В качестве источников углерода и энергии использовали фильтровальную хроматографическую и папиросную бумагу, карбоксиметилцеллюлозу и микрокристаллическую целлюлозу в количестве 15,0 г/л или целлобиозу в количестве 7,5 г/л.

Выделение сообществ и чистых культур сахаролитических микроорганизмов, активно образующих водород проводили на среде для термофильных анаэробных сахаролитических микроорганизмов (модифицированная среда Имшенецкого) следующего состава (г/л): KH_2PO_4 - 2,000; K_2HPO_4 - 3,000; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,000; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,200; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,050; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,011; дрожжевой экстракт - 1,000; пептон - 5,000; цистеин (в виде 25%-го раствора) - 0,150; микроэлементы SL-10 - 1 мл/л. Раствор микроэлементов SL-10 следующего состава (мг/л): $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 1,5; ZnCl_2 - 70,0; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 100,0; H_3BO_3 - 6,0; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 190,0; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 2,0; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 24,0; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 36,0; Na_2WO_4 - 15,0; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 15,0. pH среды - 7,0 - 7,2 до стерилизации.

Изолированные колонии водородобразующих сахаролитиков получали, выращивая культуры на агаризованной среде в трубках Бурри. В качестве источников углерода и энергии использовали глюкозу в количестве 10 г/л. Растворы глюкозы, цистеина и

микроэлементов готовили отдельно и добавляли непосредственно перед внесением инокулята.

Для контроля анаэробности в среды добавляли раствор резазурина (0,15 г/л) в количестве 1 мл/л. Среды стерилизовали при 0,5 ати в герметично закрытых флаконах объемом 450 мл (объем среды 100 мл). Выбор флаконов обусловлен необходимостью создания достаточного объема газовой фазы над средой культивирования во избежание ингибирования процесса, образующимися газовыми продуктами. Для культивирования применяли модифицированную технику Хангейта (Митрофанова, 1995). Газовую фазу во флаконах заменяли на инертный газ - аргон.

Первичный посев образцов производили вместе с кусочками разложившегося материала, присутствующего в пробах, в постоянном потоке аргона. Культивирование образцов вели при двух температурных режимах - 60°C и 70°C в условиях перемешивания на качалках (фирмы New Brunswick, США) с частотами вращения 35 и 50 об/мин. После засева остатки образцов природного материала помещали в морозильный ларь (-20°C) для хранения.

За динамикой роста культур следили по изменению оптической плотности среды при длине волны 550 нм, по степени деструкции субстрата, по динамике накопления продуктов культивирования (как жидких, так и газообразных) и снижению pH среды. При максимально возможном разложении субстрата и низком значении pH (до 4,0 - 4,5) осуществляли пересев культур на свежую среду. Качественный и количественный анализы продуктов культивирования проводили с помощью методов хроматографии.

Изучение морфологии клеток. Морфологию клеток изучали методами световой и электронной микроскопии. Окраску по Граму проводили согласно общепринятой методике (Нетрусов, 2005). Электронную микроскопию проводили на микроскопе JEOL – JSM-6380LA (Япония). Препараты для электронной микроскопии фиксировали по стандартной методике. В качестве материала напыления использовали золото и платину.

Разработка биореакторной топливной ячейки для процесса конверсии микробного водорода в электрический ток. Схематическое изображение разработанной конструкции представлено на рисунке 15. В качестве биореактора использовали толстостенный стеклянный сосуд с широким горлом (диаметр горла 80 мм). Объем сосуда составлял 500 мл. Сверху сосуд закрывали крышкой, изготовленной из полиэтилена. Для герметизации внутреннего объема ячейки между верхним фланцем горла сосуда и крышкой помещали силиконовую прокладку. В таком состоянии ячейку устанавливали на дюралевую пластину, которую посредством 4-х осей, имеющих резьбу с каждой стороны, соединяли сверху с дюралевым кольцом, прижимающим крышку к горлу сосуда. На

верхний участок резьбы металлических осей, над дюралевым кольцом, навинчивали гайки. Все 4 оси крепили сходным образом. Завинчивание 4-х гаек позволяло герметизировать ячейку.

Полиэтиленовую крышку оборудовали пятью технологическими отверстиями для интеграции в неё водородного и кислородного электродов, рН-метра, барботёра и пробоотборника. Все элементы конструкции герметизировали с помощью резиновых и силиконовых прокладок различного диаметра (рис. 15).

Соотношение объемов жидкости к газовой фазе составляло 1:4,5-5. Это соотношение обусловлено необходимостью создания достаточного объема газовой фазы над средой культивирования для предотвращения ингибирования процесса образованными газовыми продуктами.

Разработка прототипа проточной системы. Разработанный прототип проточной системы представлен на рисунке 18. Он был собран на базе ферментационной установки Liflus GX (Biotron, Южная Корея), к которой подключали водородный и кислородный блоки ТЭ. Всю систему заполняли средой культивирования микроорганизмов или буферным раствором следующего состава: 0,1 М КСl, 0,05 М КН₂РО₄. Состав буфера был выбран таким образом, чтобы его проводимость и буферная ёмкость значительно превосходили максимально требуемые значения. Замену газовой фазы осуществляли путём барботирования всей системы аргоном. Для имитации продукции водорода буферный раствор барботировали водородом с помощью генератора водорода (Хроматэк, Россия). Кислородный и водородный полуэлементы были сконструированы в виде отдельных блоков таким образом, чтобы возможно было проводить быструю замену водородного и кислородного электродов. Блоки были герметично закрыты резиновыми пробками и соединены между собой и с биореактором силиконовыми шлангами. Проток раствора через полуэлементы контролировали при помощи перистальтического насоса. Для разделения пространства между кислородным и водородным электродами использовали мембрану "Nafion". Через пространство кислородного электрода пропускали воздух, нагнетаемый аквариумным компрессором.

Методы аналитического определения продуктов ферментации. Состав газовой фазы определяли с помощью метода газовой хроматографии на хроматографе Кристалл 2000 М (Хроматэк, Россия) с катарометрическим детектором, оснащённым угольной колонкой 1000 x 2,5 мм, газ-носитель - аргон, температура термостата колонок - 150°C. Данные, полученные при проведении хроматографического анализа обрабатывали на компьютере с помощью программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (Хроматэк, Россия).

Концентрацию газа измеряли при атмосферном давлении. Избыточное давление во флаконах, образовавшееся во время культивирования, измеряли манометром и учитывали при подсчете конечной концентрации продукта.

Состав летучих жирных кислот (ЛЖК - ацетата, пропионата, бутирата и др.) в культуральной жидкости определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Для этого отбирали 1 мл культуральной жидкости, центрифугировали 10 мин при скорости 13000 g, после чего отбирали супернатант, рН супернатанта доводили до значения 2 концентрированной серной кислотой (чда). Ввод проб осуществляли хроматографическим шприцом фирмы «Hamilton», объём пробы составлял 1 мкл.

Газожидкостную хроматографию проводили на приборе Кристалл 2000 М (Хроматэк, Россия), оснащённом микрокапиллярной колонкой ZB-FFAP (Zebron, США; 15 м x 0,32 мм x 0,50 мкм). Газ-носитель — аргон, расход газа - 15 мл/мин, детектор – ПИД, температура детектора - 200°C. Измерения проводили в условиях температурного градиента в термостате от 70 до 160°C. Результаты хроматографии были обработаны при помощи программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (Хроматэк, Россия).

Для определения концентрации молочной кислоты в супернатанте использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Измерения проводили на приборе «Стайер» с УФ-детектором (Аквилон, Россия). В качестве подвижной фазы использовали бидистиллированную воду, рН которой доводили до значения 3,5 концентрированной серной кислотой (чда). Скорость потока элюента – 0,5 мл/мин. Разделение вели на колонке C18 (250 x 4,6 мм) Luna (PHENOMENEX, USA). Для каждого анализа объём вводимой пробы составил 10 мкл. Идентификацию молочной кислоты проводили по времени выхода стандартов (чистых веществ), расчет концентрации вели по площади под пиками стандартов. Отобранную пробу перед измерением центрифугировали 10 мин. при 13000 g.

Концентрацию глюкозы в среде оценивали глюкозооксидазным методом. Отобранные образцы разбавляли фосфатным буфером (0,1 М КСl, 0,05 М КН₂РO₄, рН 7,0) сообразно их предполагаемой концентрации (от 2 до 200 раз). Анализ проводили в проточно-инжекционном режиме при потенциале рабочего электрода 0 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения. Скорость потока составляла 0,65 мл/мин. В качестве отклика биосенсора на данное содержание глюкозы принимали среднее значение по результатам 2-3 измерений (в связи с дестабилизирующим действием веществ, содержащихся в образцах). Перекалибровку соответствующих участков кривой проводили после измерений 1-3 образцов. Концентрацию глюкозы в образцах определяли по предварительно построенному калибровочному графику. Построение калибровочного

графика осуществляли по результатам детекции глюкозы в проточно-инжекционном режиме в фосфатном буфере. Среднюю величину отклика вычисляли по результатам 3 единичных измерений.

Электрохимические измерения. Электрохимические измерения проводили с использованием универсальных электрохимических приборов, сопряженных с компьютером, Solartron Shlumberger Model 1286 (Великобритания) и Autolab micro3 (Нидерланды). В качестве потенциометра использовали двухканальный USB-осциллограф Disco (Россия). Поляризационные кривые записывали гальваностатическим и потенциодинамическим методом с подключением по двухэлектродной схеме. Для исследования генерируемой мощности использовали магазин сопротивлений.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью приложения Microsoft Office Excel. Эксперименты проводили в нескольких повторностях. Для полученных значений каждого эксперимента определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

1. Разработка процесса микробной переработки целлюлозы с образованием водорода

Как было показано нашими коллегами (Воронин, 2011), температурный оптимум работы ферментного электрода на базе гидрогеназы *T. roseopersicina* достаточно высок и составляет 80°C (рис. 1). Поэтому наиболее эффективно интегрировать такой электрод в среду ферментации термофильных целлюлозолитических водородобразующих микроорганизмов. В начале работы было отобрано 9 сообществ, способных к разложению целлюлозы и выделению водорода в термофильных условиях (рис. 2). Наиболее продуктивными оказались сообщества № 4, 8, и 9, то есть симбионтная микробиота пищеварительного тракта животных (коровы и пони) и образцы донных осадков пресного водоема, культивируемые при температуре 60°C. Поэтому дальнейшее культивирование вели только при этой температуре.

Позже, было выделено ещё несколько сообществ образующих водород при росте на целлюлозе. Большинство отобранных сообществ пересевали на протяжении нескольких лет (пересев осуществляли каждые 7 суток), при этом важным параметром являлась стабильность отобранных сообществ.

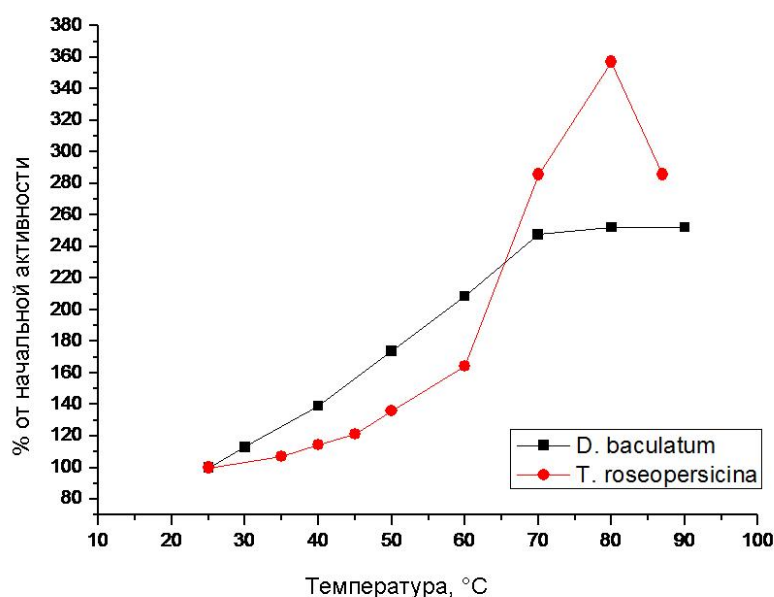


Рис. 1. Стабильность ферментных электродов в буферном растворе при различных температурах (0,05 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl , pH 7, 25°C; Воронин, 2011).

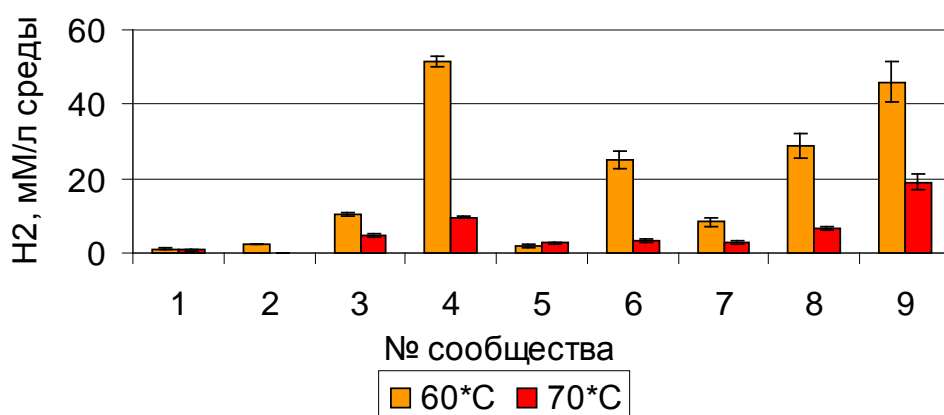


Рис. 2. Диаграмма образования водорода отобранными сообществами при 60 и 70°C (субстрат – целлюлоза; кумулятивные данные за 168 часов культивирования). 1-3 – образцы лиственного опада; 4 – образцы из экскрементов коровы; 5 – образцы из экскрементов слона; 6 – образцы из экскрементов чёрной антилопы; 7 - образцы из экскрементов пони; 8 – образцы из экскрементов антилопы гну; 9 – образцы почвы.

В конечном итоге в термофильных условиях было отобрано 5 сообществ целлюлозолитических водородобразующих микроорганизмов (рис. 3). Сообщества 1 и 3 были выделены из образцов зоны компостирования растительных остатков (время существования компостных куч: 3 месяца и 1 год соответственно). Сообщество 4 из экскрементов антилопы гну, сообщество 5 из экскрементов коровы, а сообщество 2 – это модифицированное сообщество 5, в результате работы с которым были утеряны некоторые микробные компоненты исходного сообщества, но высокая гидролитическая активность и высокая продуктивность по водороду сохранились.

Исследование сообществ методами электронной и световой микроскопии показало, что в сообществах преобладают палочкообразные формы микроорганизмов со спорами, имеются подвижные клетки. Часто микроорганизмы образуют небольшие скопления клеток вокруг частиц целлюлозы. Эти скопления погружены в экзополисахаридный матрикс. Такой матрикс способствует лучшей агрегации микроорганизмов, на поверхности целлюлозных волокон и более тесной кооперации целлюлозолитиков и сахаролитиков. Так образующиеся в процессе гидролиза целлюлозы сахара сразу потребляются сахаролитическими микроорганизмами. При таком взаимодействии целлюлозолитическая активность не ингибируется продуктами гидролиза целлюлозы, поскольку не происходит их локального накопления в области прикрепления целлюлозолитика к субстрату.

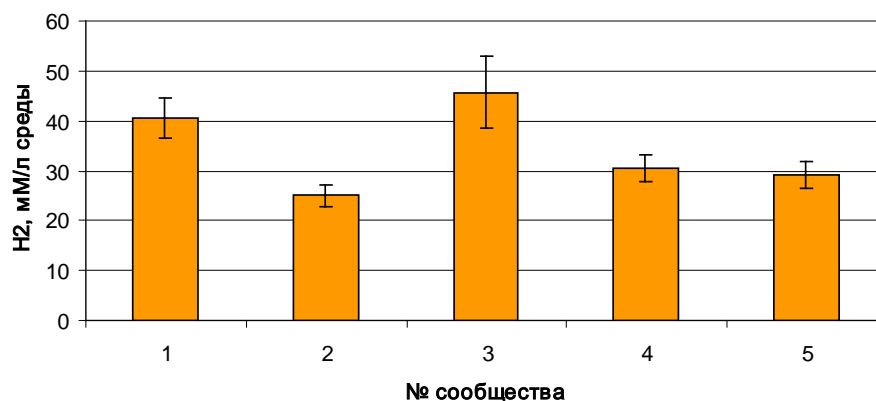


Рис. 3. Диаграмма образования водорода отобранными сообществами при 60°C (субстрат - целлюлоза; кумулятивные данные за 168 часов культивирования). 1 – зона компостирования растительных остатков (компостная куча – 3 месяца), 2 – модифицированное сообщество 5, 3 – зона компостирования растительных остатков (компостная куча – 1 год), 4 - экскременты антилопы гну, 5 - экскременты коровы.

Для понимания механизмов взаимоотношений между микроорганизмами в микробном сообществе необходимо знать его состав. Полученные нами сообщества теоретически могли включать различные виды микроорганизмов, в том числе строгих или факультативных анаэробов, таких как: *Thermoanaerobacterium* sp, *Clostridium* sp., *Thermotoga neapolitana*, *Enterobacter aerogens*, *Thermotoga elfii*, *Caldanaerobacter subterraneus* и др. Перечисленные микроорганизмы способны в процессе своего метаболизма потреблять растворённые сахара и выделять водород. Кроме того, там могут присутствовать микроорганизмы, разрушающие сложные биополимеры (гидролитики) такие как: *C. thermocellum*, *C. cellulosi*, *C. thermolacticum*, *C. thermocopriae*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* и др.

Определение таксономического состава пяти отобранных сообществ методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) показало, что большинство микроорганизмов, принадлежало одному роду, который очевидно является преобладающим в сообществах. Это род *Thermoanaerobacterium*. В том числе микроорганизмы, близкие к видам *T. thermosaccharolyticum*, *T. aotearoense*. Также были идентифицированы представители рода *Clostridium* и в частности микроорганизм близкий к *Clostridium cellulosi*. Полученный результат был ожидаем и полностью соответствовал теоретическим представлениям о термофильном целлюлозолитическом сообществе. Так многие представители рода *Clostridium* обладают мощными целлюлозолитическими ферментными системами, в то время как, виды рода *Thermoanaerobacter*, как правило, растут на легко усваиваемых сахарах и являются хорошими продуцентами водорода.

Различные представители обоих родов способны расти при высоких температурах. Так, оптимум роста *C. cellulosi* 55°C, а *T. thermosaccharolyticum* 55-60°C (Ruyet et al., 1985; Cato et al., 1986; Jin et al., 1988; Yanling et al., 1991; Glazer and Nikado, 1995).

На следующем этапе работы было проведено выделение чистых культур микроорганизмов, присутствующих в отобранных сообществах. Из сообщества № 2, на среде Имшенецкого с глюкозой в качестве субстрата, была выделена чистая сахаролитическая культура (ЧК 1). Микроорганизм имел удлинённую палочковидную форму. В основном он был представлен попарно соединёнными или одиночными клетками. В клетках присутствовали споры. При росте на глюкозе основными продуктами метаболизма были ацетат, бутират, водород и CO₂ (рис. 4).

Все сообщества целлюлозолитических микроорганизмов, пересеивали каждые 7 суток. Однако фильтровальная бумага в количестве 15 г/л среды, разрушалась за это время не полностью. По результатам взвешивания, в процессе первых семи суток культивирования наиболее активные сообщества потребляли 1/3 всего субстрата (5 г/л).

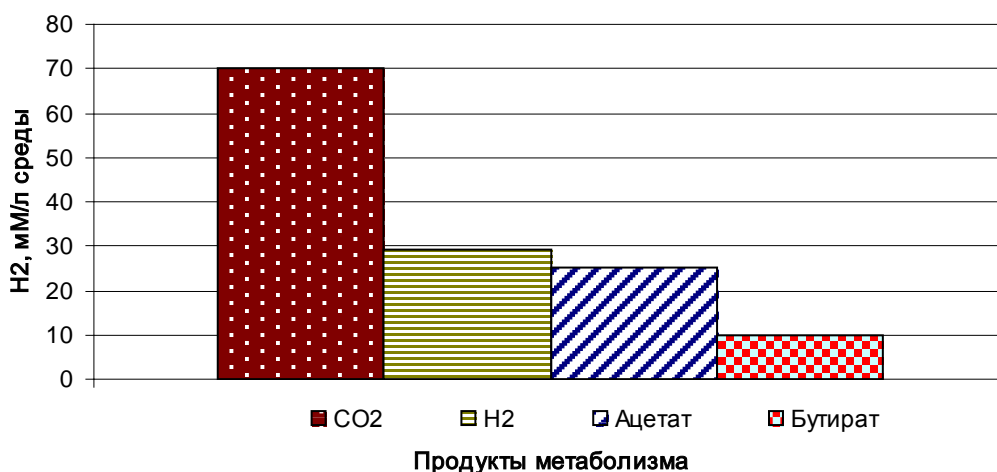


Рис. 4. Состав продуктов метаболизма образуемых сахаролитической культурой (ЧК 1; после 24 часов культивирования при 60°C, субстрат глюкоза).

Следовательно, узким местом разрабатываемого процесса переработки целлюлозы, очевидно, является время её разложения сообществом целлюлозолитических микроорганизмов. Современная практика работы с целлюлозосодержащими материалами, как правило, предусматривает предварительную обработку сырья. В частности популярен гидролиз сырья различными агентами (ферменты, кислоты, щёлочи). Используют также предобработку паром, механическое измельчение и др. Особенно эффективен и экономичен в этом отношении, процесс гидролиза слабыми растворами кислот и щелочей.

Однако, целлюлозное сырьё обработанное кислотой или щёлочью, может быть токсично для целлюлозолитических микроорганизмов. Чтобы изучить возможность эффективного гидролиза предобработанного сырья целлюлозолитическими микроорганизмами был проведён мягкий кислотный и щелочной гидролизы фильтровальной бумаги. После чего гидролизаты были промыты в воде, высушены и взвешены. Потери по массе во всех случаях составили менее 7%. Фильтровальная бумага гидролизованная растворами серной кислоты приняла порошкообразную форму, аналогичную МКЦ. Значит гидролиз серной кислотой способствовал в основном разрыву аморфных участков целлюлозных волокон без высвобождения значительного количества глюкозы. Фильтровальная бумага гидролизованная растворами щелочей, отчасти сохранила свою форму. Затем гидролизаты были использованы в качестве субстрата для сообщества микроорганизмов № 2.

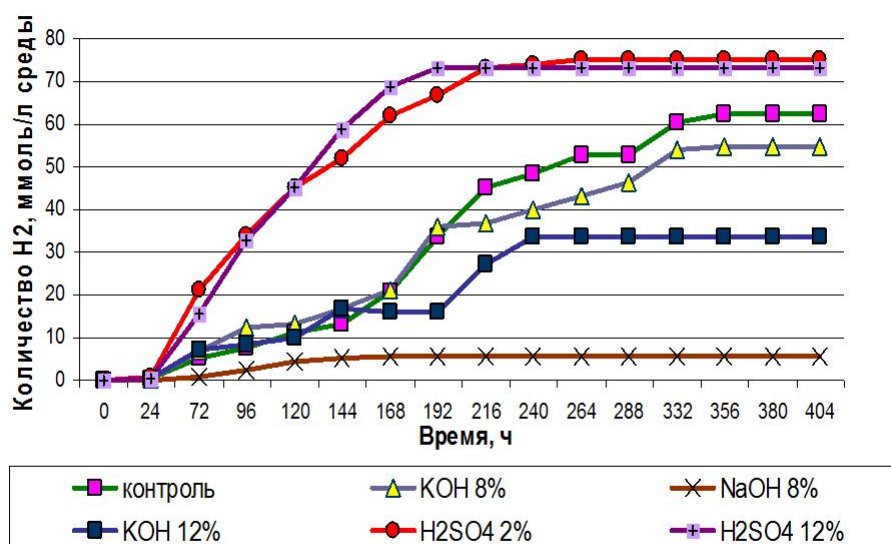


Рис. 5. Динамика накопления водорода целлюлозолитическим сообществом № 2 при росте на фильтровальной бумаге предобработанной различными способами (кислотный и щелочной гидролиз, мм H₂/1 л среды).

Было показано (рис. 5), что при использовании кислотного гидролизата в качестве субстрата, микроорганизмы образовывали максимальное количество водорода за меньшее время культивирования. В этом случае стационарная фаза роста начиналась к 192 часам культивирования (8 суток). После этого времени в культивационных флаконах не наблюдали оформленного субстрата, культуральная жидкость была однородной. Избыточное давление газов и концентрация образовавшегося водорода были низкими. Важно также подчеркнуть, что различия в продуктивности при культивировании

сообщества на фильтровальной бумаге обработанной 2% H_2SO_4 и 12% H_2SO_4 были незначительными.

В контрольных флаконах с субстратом для микроорганизмов в виде негидролизованной фильтровальной бумаги к этому времени количество водорода было в два раза меньше, чем в опытных, с кислотным гидролизатом фильтровальной бумаги. Тестируемое сообщество № 2, показало значительно более низкую продуктивность при росте на субстратах предобработанных растворами щелочей. Вероятно, растворы щелочей в большей степени ингибировали процесс микробной переработки целлюлозы, чем растворы кислот (рис. 5).

Таким образом, предобработка целлюлозного субстрата раствором 2% H_2SO_4 - это перспективный способ уменьшения времени, затрачиваемого на процесс гидролиза целлюлозы и получения водорода. Выход водорода составил 45 и 73 мМ H_2 /л за 200 час культивирования в контроле и при использовании 2% H_2SO_4 соответственно. Следует, однако, подчеркнуть, что в крупномасштабных процессах неизбежно возникновение проблем, связанных с утилизацией сульфатных солей (гипса, в случае использования мела для нейтрализации кислоты перед культивированием).

Использование для процесса микробного получения водорода необработанной фильтровальной бумаги в сравнении с предгидролизованной фильтровальной бумагой в присутствии 2% H_2SO_4 не намного снижает потенциал образования H_2 испытанным сообществом (62 мМ по сравнению с 75 мМ за 300 часов). Кроме того применение кислотного гидролиза для обработки целлюлозы ведет к ощутимым экологическим проблемам, перед которыми увеличение выхода продукта (H_2) на 20% теряет свою выгоду.

Для сообществ № 1 и № 2 изучили возможность переработки широкого спектра органических целлюлозосодержащих отходов, таких как: отходы пищевой промышленности (отруби, дрожжи, силикагель с остатками дрожжевой биомассы, зерновая дробина), пищевые отходы (продукция компании McDonalds), отходы сельского хозяйства и деревопереработки (сено, древесные опилки), бытовой мусор (различные виды макулатуры).

Для производителей пива большую проблему представляют отходы пивоваренного производства, среди которых: дробина, кизельгур (силикагель с остатками дрожжевой биомассы) и дрожжи. Эти материалы были добавлены в среды инокулированные сообществами № 1 и № 2 (рис. 6, 7).

Дрожжевую биомассу добавили в среду в количестве 40 г/л, кизельгур в количестве 100 г/л (основная масса кизельгура была представлена минеральным компонентом) и

дробину в количестве 8 г/л. Во всех случаях сообщества № 1 и № 2 росли на используемых субстратах. В случае роста на дрожжевой биомассе и на кизельгуре визуально не наблюдали уменьшения количества субстрата в культивационных флаконах. Это объясняется тем, что кизельгур представлен в основном минеральным компонентом. В то же время дрожжевая биомасса состоит из мёртвых, но не разрушенных клеток, которые являются трудноразлагаемым субстратом для анаэробной микробной переработки.

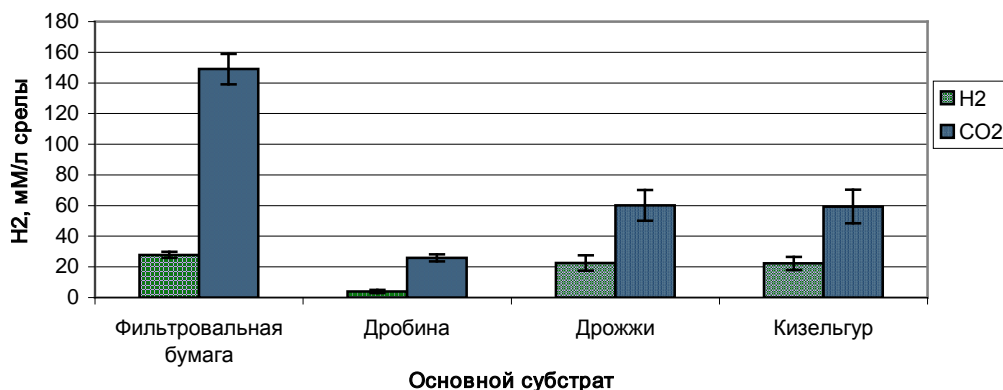


Рис. 6. Образование газообразных продуктов сообществом № 1 при росте на отходах пивоваренного предприятия (ЗАО МПБК "Очаково", г.Москва) при 60°C в течение 168 часов.

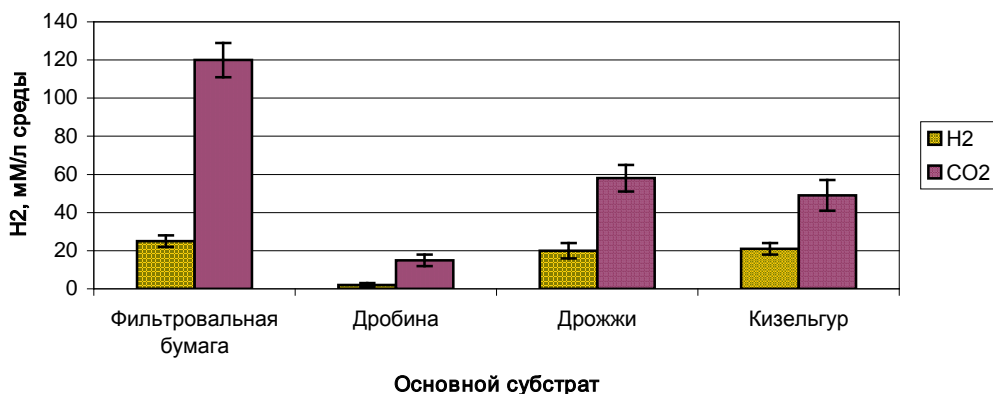


Рис. 7. Образование газообразных продуктов сообществом № 2 при росте на отходах пивоваренного предприятия (ЗАО МПБК "Очаково", г.Москва) при 60°C в течение 168 часов.

Также изучали возможность роста сообществ № 1 и № 2 на пищевых отходах, которые отличались большим разнообразием своего состава. В качестве модели был использован коммерчески доступный продукт – «Чикенбургер» (МакДоналдс, Москва),

который содержал в своём составе компоненты растительного и животного происхождения. Несколько таких продуктов гомогенизировали, высушивали в лиофильной сушке и добавляли в среды в различных концентрациях. Результаты эксперимента представлены на рисунках 8, 9.

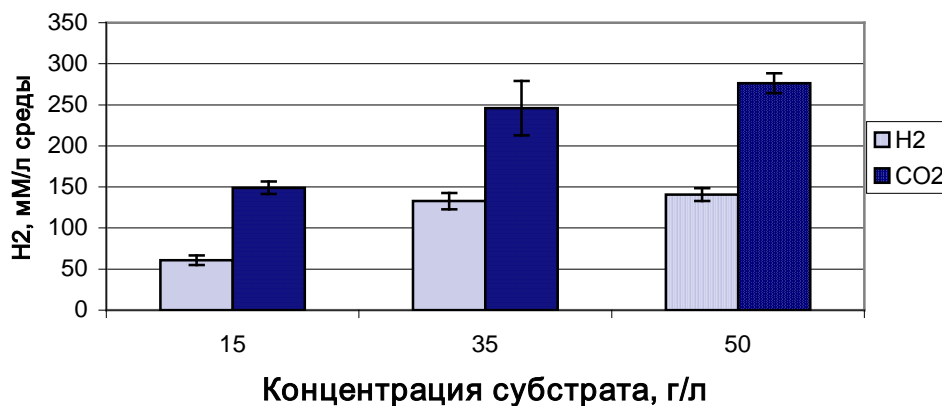


Рис. 8. Продуктивность сообщества № 1 при росте на пищевых отходах при 60°C в течение 64 часов.

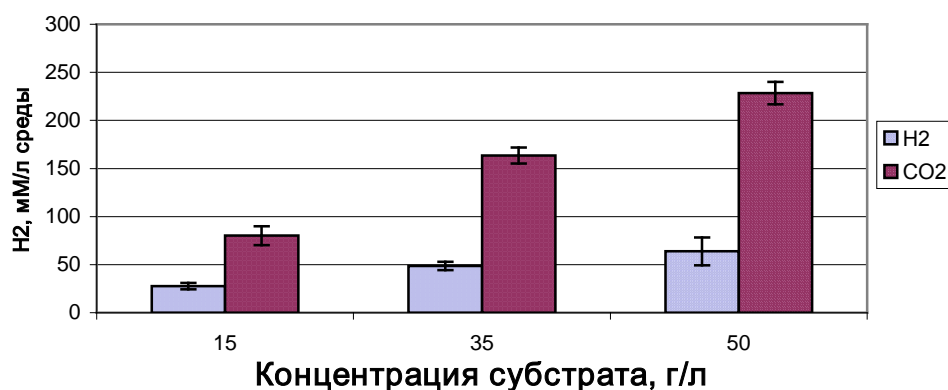


Рис. 9. Продуктивность сообщества № 2 при росте на пищевых отходах при 60°C в течение 64 часов.

После 64 часов культивирования рост давления во флаконах не фиксировали. Было показано, что при увеличении концентрации гомогензата «Чикенбургера» в среде повышается содержание образовавшихся газообразных продуктов. По результатам данного эксперимента можно с уверенностью сказать, что сырьё такого типа - это удобный субстрат для получения водорода. Вероятно, это связано с тем, что в данном продукте содержится большое количество разнообразных легкодоступных для потребления компонентов, что способствует быстрому подключению к переработке субстрата всех видов микроорганизмов в сообществе. При этом рН не успевае

настолько, чтобы остановить процесс активного потребления субстрата и выделения водорода.

Также была показана возможность роста сообществ № 1 и № 2 на сене, скошенном шестью месяцами ранее (рис. 10). По количеству образованного водорода, этот субстрат заметно уступал фильтровальной бумаге. По-видимому, это происходило из-за высокого содержания трудно расщепляемых веществ в составе стеблей и листьев сена.

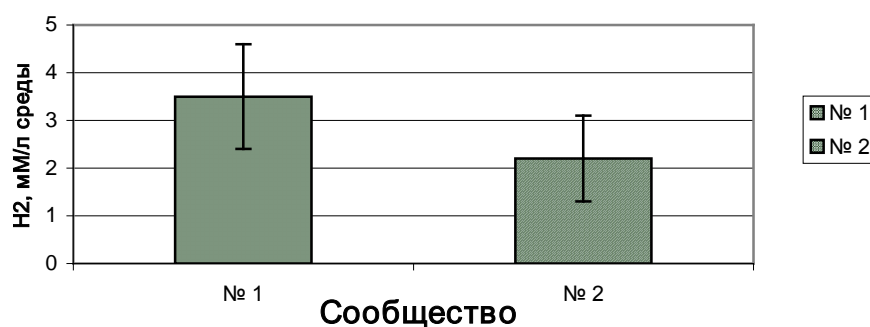


Рис. 10. Продуктивность сообщества № 1 и № 2 при росте на отходах сельского хозяйства, при 60°C в течение 168 часов.

На рисунке 11, представлен график образования водорода сообществом № 2 при росте на различных концентрациях отрубей в среде. Видно, что наиболее эффективная конверсия происходит при росте на субстрате с концентрацией 5 г/л.

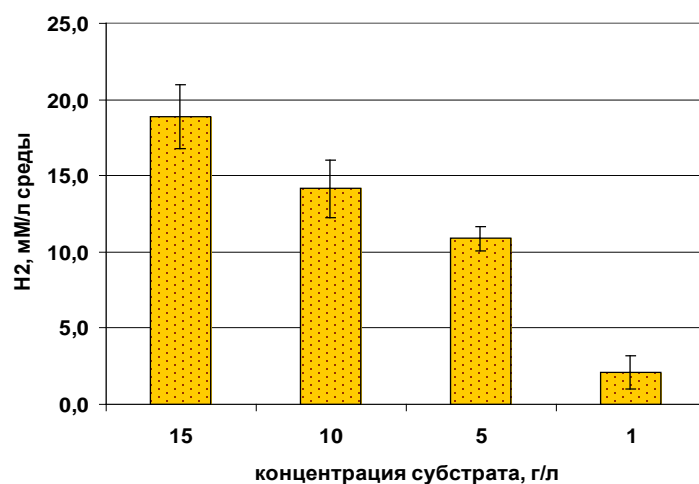


Рис. 11. Образование водорода сообществом № 2 при росте на пшеничных отрубях (при 60°C за 24 ч).

Для сообщества № 2 было проведено сравнение продуктивности по водороду при росте на фильтровальной бумаге и древесных опилках (рис. 12).

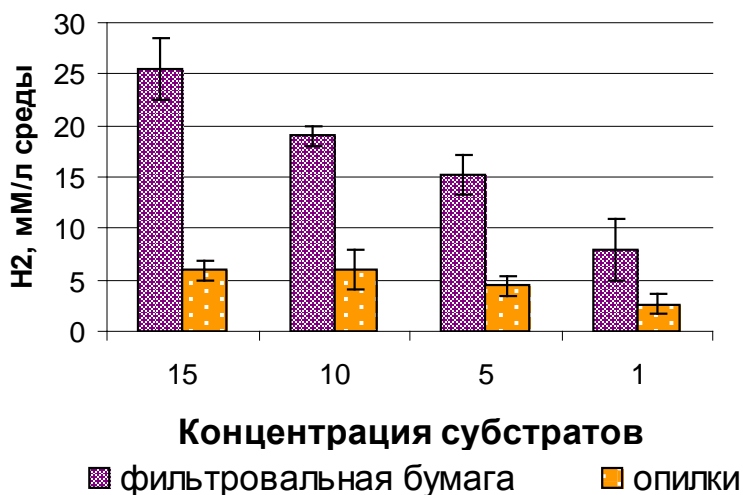


Рис. 12. Образование водорода сообществом № 2 при росте на опилках вишневого дерева (размер частиц опилок 0,1-3 мм) и на фильтровальной бумаге при 60°C в течение 168 часов культивирования.

На рисунке 12 видно, что при повышении концентрации фильтровальной бумаги количество образованного водорода также увеличивается, однако, на древесных опилках при увеличении концентрации субстрата выше 10 г/л, продукция водорода не растет. Это может быть обусловлено как недоступностью свободных волокон целлюлозы для целлюлозолитиков, так и наличием ингибирующих факторов присутствующих в подобном субстрате. Речь идет о смолах, эфирных маслах и других бактерицидных веществах, входящих в состав древесины. Кроме того, помимо целлюлозы, опилки содержат в своем составе также некоторое количество гемицеллюлоз и лигнина, который является трудно расщепляемым субстратом для микроорганизмов. Сравнивая продуктивности по водороду сообществами на фильтровальной бумаге и опилках, можно заключить, что образование водорода на бумаге в 5 раз превосходит образование водорода на опилках. Однако при всей сложности субстрата, полученное активное сообщество способно его разлагать и при этом образовывать водород.

Следующий эксперимент был проведен с сообществом № 2 на целлюлозосодержащей печатной продукции. Сообщество выращивали на среде с газетной бумагой с цветной, черно-белой печатью, а также без печати при 60°C. Тот же

эксперимент проводили с использованием журнальной бумаги тех же параметров в таких же условиях.

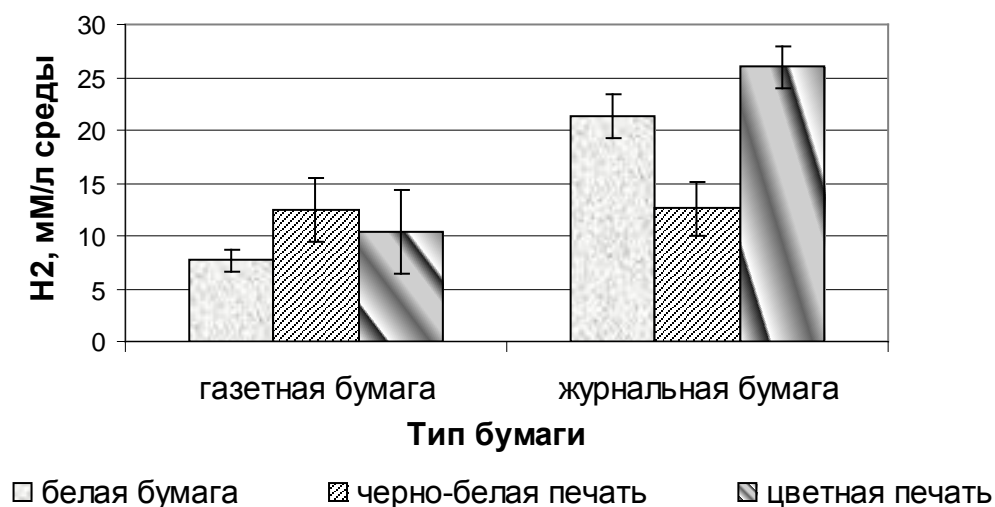


Рис. 13. Образование водорода сообществом № 2 при росте на разных типах бумаги при 60°C в течение 336 часов.

Результаты экспериментов (рис. 13) указывают на то, что наибольшее образование водорода наблюдается при росте на журнальной мелованной бумаге. Это может быть обусловлено наличием факторов роста, содержащихся в составе этого типа печатной продукции, таких например как лизин и крахмал (входящих в состав клея бумаги), различных микроэлементов входящих в состав красителей, а также увеличением буферной емкости среды культивирования за счет минеральных компонентов мелованной бумаги (мел).

Таким образом, в результате описанной серии экспериментов была показана возможность роста полученных активных сообществ микроорганизмов на различных целлюлозосодержащих органических отходах. Несмотря на ряд факторов, препятствующих разложению перечисленных субстратов полученными сообществами, была показана возможность использования этих субстратов в качестве источника углерода, а также возможность активного образования водорода.

На следующем этапе изучили процесс культивирования отобранных сообществ в режиме рН-статирования (рН 6,5). В этом случае удалось определить, что в экспоненциальной фазе роста, сообщество ЧК 1 образует до 7,2 мМ Н₂/ч*л среды при росте на глюкозе. Сообщество № 1, в экспоненциальной фазе роста гидролизовало целлюлозу со скоростью 1,5 г/сутки*л среды (0,2 мМ/ч*л среды) и образовывало до 1 мМ Н₂/ч*л среды. В конце культивирования, в ферментёре не наблюдали оформленного

субстрата, культуральная жидкость была однородной. Скорость образования продуктов метаболизма значительно снизилась.

Таким образом, было показано, что выделенная чистая культура (ЧК 1), является активным продуцентом водорода при росте на легкодоступном субстрате (глюкоза). Скорость образования водорода для ЧК 1 составила 7,2 мМ Н₂/ч*л среды. В свою очередь и тестируемое сообщество целлюлозолитических водородобразующих микроорганизмов № 1, также отличалась достаточно высокой продуктивностью по образованию водорода, но уже при росте на фильтровальной бумаге. Скорость образования водорода для сообщества № 1 составила 1 мМ Н₂/ч*л среды.

2. Создание технологии окисления микробного водорода с образованием электрического тока в системе ТЭ

Электроды на основе фермента гидрогеназы были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории электрохимических методов анализа кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Электроды представляли собой кусочки графитовой ткани (1 см²), на которых был иммобилизован фермент.

При непрерывном испытании ферментных электродов в модельной системе имитирующей среду ферментации было показано, что они сохраняют около 80% активности в течение 28 дней (более 670 часов).

Этот значительный результат позволил перейти к следующему этапу определения параметров работы водородных электродов, к инкубации электродов непосредственно в среде культивирования микроорганизмов. Для испытания в среде ферментации целлюлозолитического сообщества № 2 и чистой сахаролитической культуры ЧК 1 были использованы ферментные электроды, сделанные на базе тканевой основы (ЛШГ) и на базе войлока.

Ферментные электроды, изготовленные на основе войлока, показали себя с лучшей стороны в сравнение с тканевыми электродами. Этот материал имел толщину до 0,5 мм, при этом значительная часть фермента при иммобилизации оказывается погруженной во внутренний объем материала. Электрохимические характеристики ферментных электродов на основе войлока при пересчете на геометрическую площадь аналогичны электродам на основе ЛШГ. При инкубации в топливной ячейке электроды на основе войлока демонстрировали аналогичную тканевым электродам динамику падения активности, но нижний предел был более чем на 30% выше, чем для тканевых электродов. По-видимому, это связано с тем, что модификация поверхности электрода полипирол-виологеном и последующая иммобилизация фермента в случае использования войлока

позволила в большей степени защитить фермент от негативного влияния метаболитов, гидролитических ферментов и снижения pH, а также, позволила более крепко иммобилизовать фермент на поверхности электрода в сравнение с использованием ЛШГ.

На рисунке 14 представлены данные непрерывного измерения электрохимической активности электродов при постоянной нагрузке после максимальной активации ферментного электрода (через 15 часов после внесения инокулята) в течение 70 часов. Нагрузка была подобрана таким образом, чтобы перенапряжение достигало 200 мВ относительно потенциала разомкнутой цепи. Данные снимали в непрерывном режиме каждые 0,1 сек., на графике представлены усреднённые данные за каждые два часа.

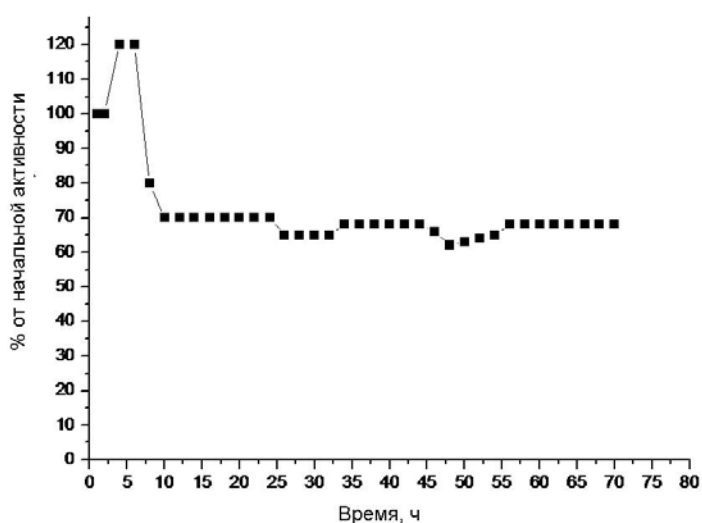


Рис. 14. Стабильность ферментного ТЭ при поглощении водорода, образуемого ЧК 1 в течение 70 часов (концентрация водорода в газовой фазе 21,5%, субстрат глюкоза, температура 60°C, электродный материал – войлок).

В течение первых шести часов после активации электрода наблюдали рост активности, вызванный продолжающейся стадией выделения газа микроорганизмами, затем падение активности до уровня в 70% от начального из-за снижения pH и, предположительно, удаления плохо связанного и легкодоступного для разрушения фермента с поверхности электрода. К 10-му часу значение тока стабилизируется на уровне 70% от первоначальной активности и остаётся практически без изменений. Небольшие колебания на 25-ом и 50-ом часах, объясняются снижением окружающей температуры, поскольку раз в сутки реактор вынимали из термостата для проведения процедур контроля pH, давления, состава газовой фазы и т.д. В эти отрезки времени температура среды культивирования опускалась до комнатной, а избыточное давление газов в реакторе уменьшалось.

В ходе работы, была разработана биореакторная топливная ячейка, совмещающая в себе биореактор и ферментный ТЭ (рис. 15).

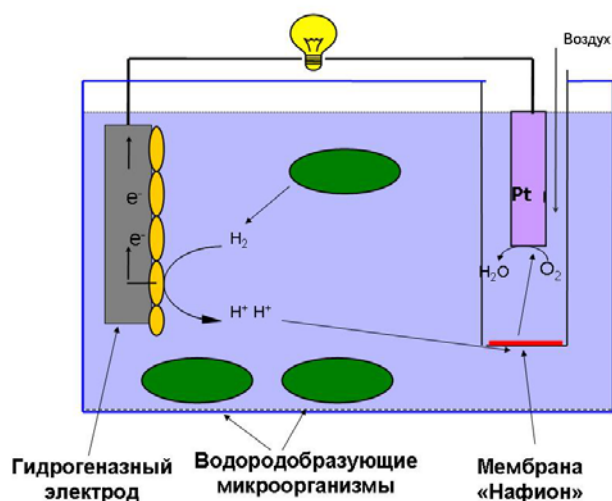


Рис. 15. Схематическое изображение и фотография биореакторной топливной ячейки: 1 - контакт ферментного электрода, 2 - кислородный электрод, 3 - воздушный шланг, 4 – мембрана для отбора проб в процессе эксперимента, 5 – система сброса избыточного давления, 6 – ферментный электрод.

В биореакторной топливной ячейке проводили эксперименты по периодическому культивированию как целлюлозолитического сообщества микроорганизмов (сообщество № 2), используя в качестве субстрата фильтровальную бумагу, так и сахаролитического микроорганизма (ЧК 1) используя в качестве субстрата глюкозу.

После внесения инокулята в среду ферментации проводили измерение потенциала разомкнутой цепи. Снижение этого значения является показателем появления в среде водорода. Заметное падение потенциала наблюдали при содержании водорода в газовой фазе менее 0,1 %. Практически полная активация происходила в среднем через 12-16 часов после внесения инокулята.

Вольтамперная характеристика для электрода погружённого в среду ферментации микроорганизмов представлена на рисунке 16. Отличие потенциала разомкнутой цепи от теоретического объясняется снижением рН среды до значения 4,5 - 5,0, что значительно влияет на активность гидрогеназы. Максимальная мощность, которую способен поддерживать гидрогеназный электрод площадью 1 см² составила 220 мкВт. Она достигается при перенапряжении 400 мВ относительно разомкнутой цепи. Зависимость мощности от потенциала представлена на рисунке 17.

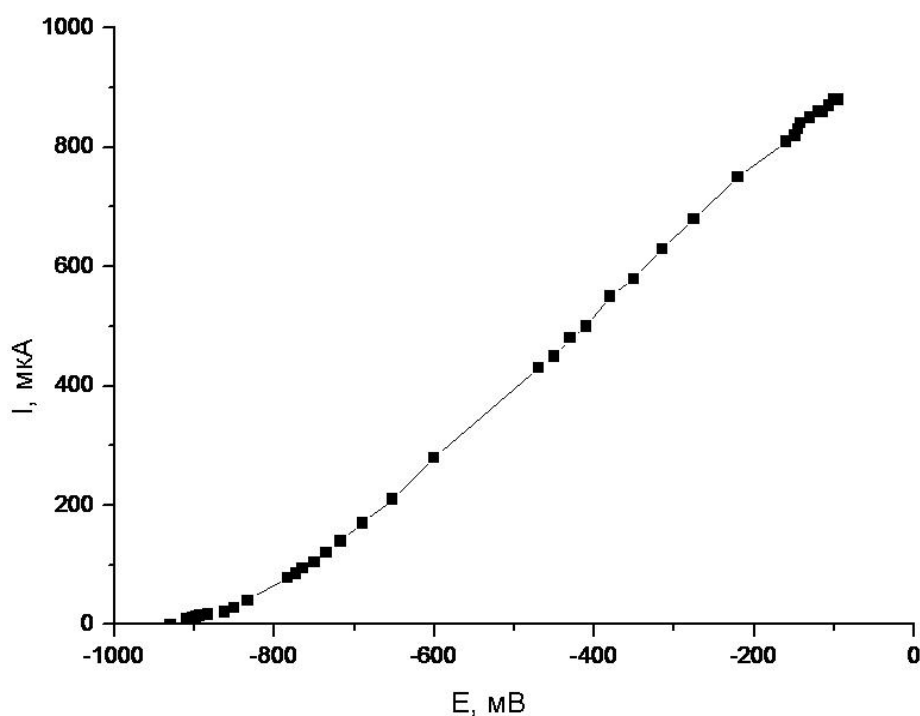


Рис. 16. Вольтамперная характеристика топливной ячейки в процессе культивирования ЧК 1 (содержание водорода в газовой фазе 24%, температура 60°C, pH 4,5).

Однако электрод площадью 1 см^2 не способен окислить весь образованный водород, так как, активность фермента по поглощению водорода составляет $100 \text{ мкМ/мин} \cdot 1 \text{ мг}$ белка (Воронин, 2011). На одном графитовом электроде площадью 1 см^2 иммобилизуется 4,5-6,5 мкг фермента. Отсюда можно рассчитать, что 1 электрод площадью 1 см^2 способен окислить в среднем всего около $30 \text{ мкМ H}_2/\text{час}$. Однако при увеличении площади водородного и кислородного электродов теоретически мощность должна возрасти.

На следующем этапе разработали технологическую схему, позволяющую объединить ферментный топливный элемент и ферментёр, который позволял вести полностью контролируемый и управляемый процесс культивирования водородобразующих микроорганизмов.

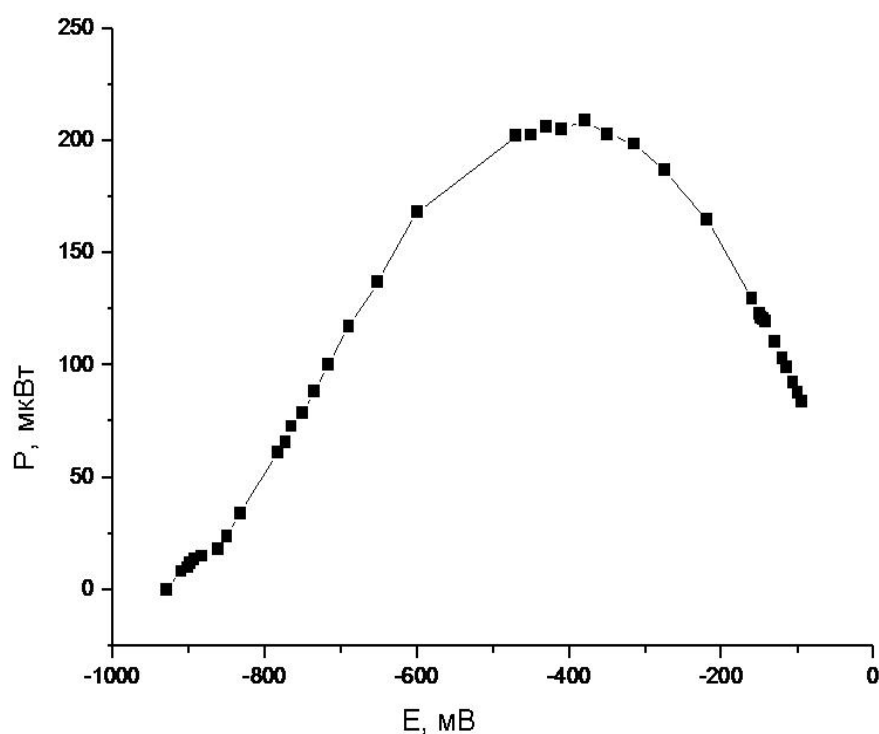


Рис. 17. Зависимость мощности электрического тока от перенапряжения топливной ячейки в процессе культивирования ЧК 1 (содержание водорода в газовой фазе 24%, температура 60°C, pH 4,5).

Таким образом была сконструирована лабораторная установка для переработки органических отходов в водород и электроэнергию, совмещающая в себе технологии микробного биореактора и ферментного топливного элемента (рис. 18). Была показана возможность образования водорода из целлюлозы и окисления образующегося водорода в электроэнергию непосредственно в среде культивирования целлюлозолитического сообщества № 1. Стабильность работы установки составила не менее 5 суток. Максимальная мощность электрического тока достигла 40 мкВт/см² ферментного электрода. Это в 5 раз меньше чем значение, полученное при работе с биореакторной топливной ячейкой. Такая разница связана с влиянием избыточного давления водорода на работу ферментного электрода. Высокое избыточное давление способствовало увеличению количества растворённого водорода в среде ферментации. Так в биореакторной ячейке избыточное давление газов достигало 1,5 атм, в то время как в проточной системе образующиеся газы сразу стравливали.

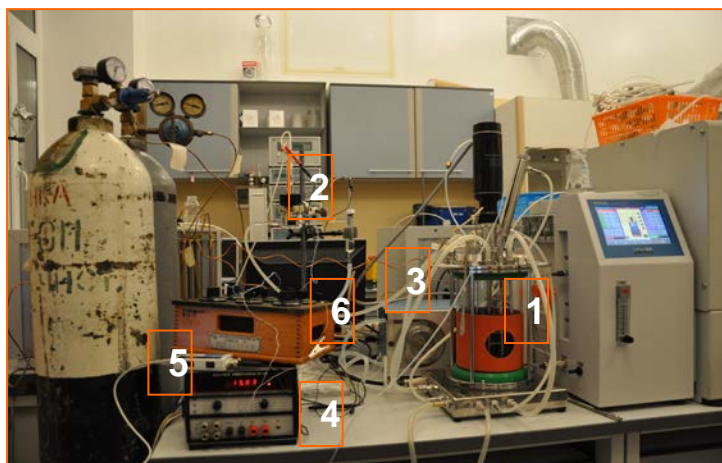


Рис. 18. Разработанный прототип проточной системы. 1 - ферментёр Liflus GX, 2 – ТЭ, 3 – перистальтический насос, 4 – универсальный амперметр, 5 – универсальный вольтметр, 6 – магазин сопротивлений.

Попытки объединить биореактор и ТЭ, работающий на водородном топливе, предпринимались и ранее (Dante, 2005; He et al., 2005; García-Peña et al., 2009). В этих работах водород образуемый фототрофными микроорганизмами окисляли на платиновых электродах. Лучшие образцы ферментных ТЭ (не на основе гидрогеназы) достигают мощности $500-700 \text{ мкВт/см}^2$ (Palmore et al., 1998; Katz et al., 2003; Yuhashi et al., 2005). В работе (Katz et al., 2003) описан ферментный ТЭ на основе глюкозооксидазы (анод) и цитохромоксидазы (катод), мощность которого составила 550 мкВт/см^2 . Однако в данных работах не проводили интеграцию ферментных ТЭ с микробным биореактором.

Операционная стабильность ферментных ТЭ исчисляется, как правило, часами, реже 1-2 днями. Но встречаются и исключения – например, у Yuhashi et al., (2005) описан ТЭ на основе глюкозодегидрогеназы/билирубиноксидазы, непрерывно функционировавший в течение 152 часов. В представленной работе стабильность системы составила не менее 120-ти часов и это далеко не предел для разработанной установки. Поскольку после извлечения из среды культивирования микроорганизмов электрод восстанавливал до 90% первоначальной активности.

Итак, нами впервые были разработаны системы, совмещающие ферментный ТЭ на основе гидрогеназы и термофильный анаэробный микробный биореактор. Мы показали, что разработанные системы стабильны в присутствии всех групп соединений, выделяемых используемыми сообществами микроорганизмов. Максимальная мощность, которая была достигнута, составила 220 мкВт/см^2 ферментного электрода.

ВЫВОДЫ

1. Из более чем 50-ти природных биотопов выделены активные анаэробные микробные сообщества и чистые культуры микроорганизмов, разлагающие целлюлозу в термофильных условиях (60°C) с образованием значительного количества водорода и жирных кислот. Из них отобрано 5 наиболее продуктивных сообществ, для которых определена таксономическая принадлежность основных микробных компонентов.
2. Показана возможность переработки выделенными сообществами различных целлюлозосодержащих отходов.
3. Впервые доказана возможность использования гидрогеназных электродов в среде культивирования анаэробного термофильного целлюлозолитического сообщества и чистой сахаролитической культуры. Разработана технология объединения анаэробного термофильного микробного биореактора и ферментного топливного элемента. На основе технологии сконструировано несколько прототипов биореакторной топливной ячейки. Максимальная мощность генерируемого тока в процессе работы ячейки составила 220 мВт/см^2 при перенапряжении 400 мВ.
4. Разработана лабораторная установка по переработке целлюлозы в водород и электроэнергию термофильным микробным сообществом. Максимальная скорость разложения целлюлозы и образования водорода целлюлозолитическим сообществом № 1 составила $1,5 \text{ г/сутки*л среды}$ ($0,2 \text{ мм/ч*л среды}$) и $1 \text{ мм H}_2/\text{ч*л среды}$ соответственно, а максимальная мощность электрического тока - 40 мВт/см^2 при перенапряжении 400 мВ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в рецензируемых журналах

1. *Netrusov A., Abramov S., Sadraddinova E., Shestakov A., Shalygin M., Teplyakov V.* Membrane-assisted separation of microbial gaseous fuels from renewable sources // *Desalination and Water Treatment*, 2010. 14: 252-258.
2. *Абрамов С.М., Садраддинова Э.Р., Шестаков А.И., Шалыгин М.Г., Нетрусов А.И., Тепляков В.В.* Превращение органических отходов сельского хозяйства в топливо для альтернативной энергетики // *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2010. 1: 8-11.
3. *Нетрусов А.И., Карякин А.А., Тепляков В.В., Шалыгин М.Г., Воронин О.Г., Абрамов С.М., Садраддинова Э.Р., Митрофанова Т.И., Глазунова Е.В., Шестаков А.И.* Основы технологии микробиологической конверсии органических целлюлозосодержащих отходов в электроэнергию через промежуточное образование биоводорода // *Катализ в промышленности*, 2010. 5:78-84.

Тезисы докладов

1. *Абрамов С.М., Садраддинова Э.Р., Шестаков А.И., Митрофанова Т.И., Глазунова Е.В., Воронин О.Г., Карякин А.А., Нетрусов А.И.* Микробная конверсия целлюлозосодержащих отходов в водород и использование ферментного топливного элемента для преобразования водорода в электроэнергию. Сборник материалов Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (2009 г., Москва, МГУ им. М.В.Ломоносова), с. 15.
2. *Абрамов С.М., Садраддинова Э.Р.* Переработка органического сырья и отходов в электроэнергию консорциумом гетеротрофных микроорганизмов через промежуточное образование биоводорода. Тезисы докладов третьей международной конференции «Современные достижения бионаноскопии» (16-18 июня 2009 г., Москва, МГУ им. М.В.Ломоносова), с. 9-10.
3. *Садраддинова Э.Р., Абрамов С.М., Шестаков А.И., Митрофанова Т.И., Глазунова Е.В., Шалыгин М.Г., Нетрусов А.И., Тепляков В.В.* Термофильная микробная конверсия целлюлозосодержащего органического сырья и отходов в водород с использованием мембранных технологий газоразделения. Сборник материалов Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (2009 г., Москва, МГУ им. М.В.Ломоносова), с. 159.
4. *Netrusov A., Shestakov A., Voronin O., Sadraddinova E., Abramov S., Shalygin M., Teplyakov V., Karyakin A.* Green energy from organic raw materials and wastes. Материалы

международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов» (14-17 марта 2010 г., Москва), с. 293-294.

5. *Воронин О.Г., Абрамов С.М., Карякин А.А.* Высокоактивные ферментные электроды для утилизации биоводорода, полученного при микробиологической переработке органических отходов. Сборник тезисов 5-го Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (16-20 марта 2009 г., Москва), с. 316.

6. *Нетрусов А.И., Шестаков А.И., Воронин О.Г., Садрадинова Э.Р., Абрамов С.М., Шалыгин М.Г., Тепляков В.В., Карякин А.А.* Устойчивая система получения водорода и электротока при термофильной переработке целлюлозы и отходов. Сборник тезисов докладов международной конференции EurAsiaBio-2010 (13-15 апреля 2010 г., Москва), с. 136-137.

7. *Netrusov A., Abramov S., Sadraddinova E., Shestakov A., Mitrofanova T., Glazunova E., Shalygin M., Teplyakov V.* Thermophilic microbial conversion of cellulose-containing organic waste to hydrogen using membrane-assisted gas separation technology. Abstract book of PERMEA-2010 conference: Membrane science and technology conference of Visegrád Countries, Tatranské Matliare, (September 4-8, 2010, Slovakia), p. 97.

8. *Абрамов С.М., Садрадинова Э.Р., Шестаков А.И., Митрофанова Т.И., Глазунова Е.В., Воронин О.Г., Карякин А.А., Нетрусов А.И.* Микробная конверсия целлюлозосодержащих отходов в водород и использование ферментного топливного элемента для преобразования водорода в электроэнергию. Сборник материалов Всероссийского симпозиума с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (2010 г., Москва, МГУ им. М.В.Ломоносова), с. 13.