

**Н.А. Матвеева, А.С. Левишко, И.Р. Притула, А.А. Таширева,
П.В. Рокитко, А.Б. Таширев**

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д 13680, Украина

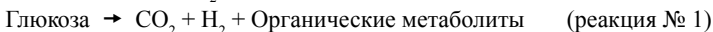
ОБРАЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА АССОЦИАЦИЕЙ СПОРООБРАЗУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Выделена технологически перспективная микробная ассоциация, состоящая из анаэробных и анаэробных спорообразующих бактерий. Ассоциация синтезирует молекулярный водород при сбраживании картофеля, а также крахмала. Ассоциация выделена из почвы, пастеризованной на кипящей водяной бане. В течение 5-7 суток ассоциация разрушает картофель с уменьшением его массы в 17,4 раза и синтезирует газ, состоящий на 60 % из H_2 .

Ключевые слова: микробный синтез водорода, деструкция органических соединений, спорообразующие бактерии

Водород – экологически безопасный вид топлива, т.к. продуктом его сгорания в кислороде является вода. Преимуществом его использования в качестве топлива является то, что он имеет высокую теплоту сгорания и не образует токсичных продуктов. Он практически не встречается в природе в виде газа и может быть получен с помощью электрохимических и химических методов. Альтернативным методом получения H_2 является его микробный синтез. К преимуществам микробиологического получения H_2 относятся относительная простота и дешевизна процесса. Субстратом для синтеза H_2 могут быть органические отходы и сточные воды некоторых производств [5, 11], что в значительной степени снижает себестоимость производства H_2 , а также уменьшают загрязнение окружающей среды промышленными и бытовыми отходами. Перспективными для промышленного синтеза H_2 являются микроорганизмы, способные к брожению такие как анаэробные *Clostridium* spp. и факультативно анаэробные *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* и др. При анаэробной деструкции субстрата образуются газообразные продукты (H_2 и CO_2), а также водорастворимые экзометаболиты. Так, при росте на глюкозе образуются H_2 и CO_2 , а также водорастворимые органические кислоты (ацетатная, пропионовая) и спирты (метанол, этанол, пропанол и др.) [10]:

Состав конечных продуктов брожения зависит от субстрата (источника углерода и энергии), особенностей микробного метаболизма и терминальных акцепторов электронов. Например, в отсутствие акцепторов *E. coli* сбраживает глюкозу с образованием H_2 и CO_2 (реакция № 1). При наличии таких акцепторов, как O_2 или NO_3^- , единственным газообразным продуктом является CO_2 (реакции № 2 и 3) [6]:



Таким образом, микробный синтез H_2 определяется типом метаболизма и наличия терминальных акцепторов электронов. Субстратами для бактерий, синтезирующих H_2 , могут служить целлюлоза, целобиоза, глюкоза [14, 15], летучие жирные кислоты, сахароза, крахмал, меласса [7, 8]. Бактерии рода *Clostridium* способны сбраживать с образованием H_2 ряд соединений, таких как глюкоза, целлюлоза, целлобиоза и др. [12, 14]. Известны исследования по изучению синтеза водорода клостридиями при использовании в качестве субстрата сточных вод спиртового производства [15].

Эффективность синтеза водорода зависит от используемого штамма, субстрата, температуры, состава среды и других параметров [13]. Концентрация водорода в синтезируемом бактериями газе, согласно литературным данным, составляет 30-75 % [8]. В настоящее время в биотехнологических процессах используют как отдельные штаммы микроорганизмов-продуцентов H_2 , так и микробные ассоциации [12]. Ассоциации могут включать ряд микроорганизмов, например, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium acetobutyricum*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum* [12]. Использование ассоциаций имеет преимущества в том, что несколько штаммов могут ферментировать одновременно широкий спектр субстратов, таким образом,

© Н.А. Матвеева, А.С. Левишко, И.Р. Притула, А.А. Таширева, П.В. Рокитко, А.Б. Таширев, 2010

повышая эффективность и рентабельность процесса синтеза H_2 . В то же время, при использовании ассоциаций микроорганизмов могут происходить нежелательные для технологии получения H_2 конкурентные процессы. Например, рост ацетогенных, метаногенных и сульфатовосстанавливающих микроорганизмов приводит к потреблению H_2 и к снижению его выхода [3].

В последнее время актуальной стала разработка биореакторов для микробного синтеза H_2 [7, 8, 9]. В установках для синтеза H_2 используют как микробные ассоциации, так и чистые культуры микроорганизмов. Создание биореакторов позволяет не только получать в промышленных объемах водород, но и перерабатывать экологически опасные промышленные органические отходы [10].

Целью нашей работы было изучение возможности использования микробной ассоциации спорообразующих микроорганизмов для получения молекулярного водорода при деструкции твердых пищевых отходов. Для этого нами выделена ассоциация микроорганизмов, состоящая из аэробных и облигатно-анаэробных спорообразующих бактерий. Мы предположили, что аэробные бактерии, р. *Bacillus* в процессе роста потребляют O_2 и создают анаэробные условия, необходимые для роста облигатно-анаэробных бактерий р. *Clostridium* и синтеза H_2 . В качестве «модельных» твердых пищевых отходов использовали картофель и крахмал.

Материалы и методы. Для получения накопительной культуры H_2 -синтезирующих спорообразующих бактерий использовали кожуру, срезанную с клубней картофеля, и почву. Эти компоненты (в весовом соотношении 1:1) кипятили на водяной бане в течение 10 мин в 5 пробирках, на $\frac{3}{4}$ заполненных водопроводной водой. Пробирки закрывали резиновыми пробками, и инкубировали при 20°C на протяжении 7 суток. Рост микроорганизмов в накопительной культуре определяли визуально. Критериями роста служили помутнение жидкой фазы (рост микроорганизмов), синтез газа (пузырьки в среде и образование пены на поверхности) и деструкция картофеля. Одну пробирку, в которой наиболее интенсивно происходил рост микроорганизмов и синтез газа, использовали для дальнейших экспериментов по выделению ассоциации, эффективно синтезирующей H_2 .

Флаконы, закрытые ватно-марлевыми пробками, стерилизовали автоклавированием (1,5 атм.), а затем в них вносили кубики нативного (сырого) стерильного картофеля, питательную среду и инокулят (ассоциацию микроорганизмов). Питательная среда (раствор А) для культивирования ассоциации имела следующий состав (в г/л): $NH_4Cl - 2,0$; $K_2HPO_4 - 2,0$; $Na_2SO_4 - 0,1$; Раствор А автоклавировали при 1,5 атм. Дрожжевой экстракт (раствор Б) стерилизовали автоклавированием при 0,5 атм. 20 минут, который вносили в среду в концентрации 0,2 г/л.

Закономерности синтеза водорода при деструкции картофеля ассоциацией микроорганизмов изучали следующим образом. Микробную ассоциацию культивировали в стеклянных флаконах объемом 100 мл с винтовой резьбой на горловине. В каждый флакон вносили дрожжевой экстракт, 10 г стерильного нативного (сырого) картофеля и 3 мл инокулята. Значение рН находилось в пределах 6,8–7,5. Объем жидкой фазы во флаконах равен 70 мл, а объем воздуха – 30 мл. Флаконы герметично закрывали стерильными эластичными резиновыми пробками, и навинчивающимися колпачками с отверстиями для отбора проб из флаконов. Ассоциацию культивировали при температуре +20 °С.

Для получения нативного стерильного картофеля, целые клубни тщательно отмывали вначале водопроводной водой, а затем – абразивной губкой в растворе 5 % ПАВ (стиральный порошок «Лотос»). Клубни картофеля отмывали от раствора ПАВ стерильной дистиллированной водой и высушивали. После чего очищали от кожуры стерильным скальпелем и нарезали кубиками с размером ребра около 0,5 см. Кубики подсушивали в чашке Петри между двумя слоями стерильной фильтровальной бумаги, а после высушивания картофель стерилизовали фломбированием в пламени газовой горелки и вносили во флаконы со стерильной жидкой средой.

Для пересчета массы нативного (сырого) картофеля на абсолютно сухую массу (АСМ) использовали коэффициент *Km*. Коэффициент $Km = m_1 : m_2$, где m_1 – масса нативного, а m_2 – масса сухого картофеля. Нативный картофель взвешивали в трех повторностях, высушивали при 100 °С до постоянного веса, охлаждали до комнатной температуры, а затем вновь взвешивали. Установлено, что $Km = 3,82$, – т.е. 10 г нативного картофеля эквивалентны 2,62 г абсолютно сухой массы картофеля.

Для отбора проб газа и культуральной жидкости использовали пластиковые стерильные шприцы (фирма «Вауер») объемом 2,5, 11 и 22 мл. Пробы отбирали, прокалывая иглой шприца резиновую пробку флакона.

Объем и состав газа определяли ежесуточно. Объем синтезированного газа измеряли по шкале шприца (выдавливание поршня шприца избыточным давлением газа).

Состав газовой фазы определяли по стандартной методике на газовом хроматографе ЛХМ-8-МД [1]. Использовали две стальные колонки – одна (I) для анализа H_2 , O_2 , N_2 и CH_4 , другая (II) – для анализа CO_2 . Параметры колонок: I – $l = 3$ м, $d = 3$ мм, сорбент 13X (NaX); II – $l = 2$ м, $d = 3$ мм, сорбент Рогарак-Q; температура колонок, испарителя и детектора + 50 °С, ток детектора – 50 мА. Газ-носитель – аргон; скорость протока газа – 30 мл/мин. Содержание газов (в %) – H_2 , CO_2 , N_2 и O_2 , рассчитывали по стандартной методике по площади пиков компонентов газовой фазы.

Детрит (высокодисперсные остатки) после деструкции картофеля трижды осаждали центрифугированием и отмывали в дистиллированной воде. Затем детрит отделяли фильтрованием через взвешенный бумажный фильтр, высушивали до постоянного веса при 100 °С и вновь взвешивали. Эффективность деструкции картофеля выражали с помощью коэффициента деструкции картофеля $K_d = m_1 / m_2$ (где m_1 и m_2 – соответственно начальная и конечная сухая масса картофеля). Расчеты проводили, определяя среднее арифметическое из 3 повторностей.

Для выделения изолированных колоний спорообразующих аэробных бактерий, культуральную жидкость после сбраживания картофеля прогревали на кипящей водяной бане в течение 10 минут. После чего ее охлаждали при комнатной температуре, а затем высевали в аэробных условиях в чашках Петри на плотную питательную среду следующего состава: (в г/л): K_2HPO_4 – 2,4; NH_4Cl – 2,0; Na_2SO_4 – 0,2; дрожжевой экстракт – 0,2; крахмал – 20,0; агар-агар – 20,0. Микроорганизмы культивировали при температуре 36 °С на протяжении 7-10 суток.

Для характеристики выделенной ассоциации микроорганизмов использовали световую микроскопию препаратов живых клеток («раздавленная капля»), а также фиксированных, – окрашенных по Граму и методу Пешкова для определения наличия спор [4].

Результаты и их обсуждение. Для получения микробной ассоциации, которая может одновременно осуществлять деструкцию органических соединений и синтез водорода, был использован способ, который включал пастеризацию почвы в водопроводной воде с последующим культивированием в герметично закрытых пробирках. Инокулят из этих пробирок был использован в экспериментах по получению водорода при сбраживании картофеля.

Предполагалось, что пастеризация картофеля позволит получить ассоциацию, в состав которой входят аэробные и анаэробные спорообразующие бактерии (р. *Bacillus* и р. *Clostridium*). Особенность этой ассоциации заключается в том, что вначале рост аэробных бактерий приводит к быстрому потреблению кислорода воздуха в сосуде и созданию анаэробных условий, необходимых для последующего роста анаэробных клостридий.

Определение состава газа подтвердило наше предположение. Так, в течение первых двух суток отмечалось быстрое снижение концентрации кислорода, и одновременно – увеличение концентрации водорода (рис. 1). Через 4 суток газовая фаза содержала только водород и углекислый газ, которые являются характерными продуктами сбраживания картофеля анаэробными микроорганизмами.

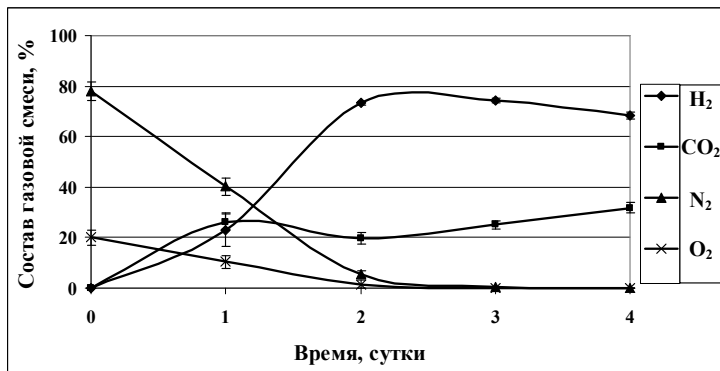


Рис. 1. Состав газовой смеси при микробной деструкции картофеля ассоциацией микроорганизмов в течение 4 суток

Уже через 1 сутки культивирования кубики картофеля всплывали, а на поверхности культуральной жидкости образовывалась пена. Причиной этого являлся активный рост газообра-

зующих микроорганизмов, как на поверхности, так и внутри кубиков картофеля. На 3-4 сутки наблюдалась постепенная деструкция картофеля с осаждением на дне флаконов высокодисперсного детрита. В течение 5-7 суток происходила полная деструкция картофеля. Коэффициент деструкции картофеля составлял 17,35:

$$K_d = m_1 : m_2 = 2,62 : 0,151 = 17,35$$

Таким образом, масса сухого картофеля уменьшилась в 17,35 раза.

Процесс деструкции органических соединений сопровождался синтезом газа. Образование газа начиналось на вторые сутки, причем максимальный объем синтезированного за сутки газа составлял 56 мл (рис. 2). Синтез газа длился не только во время деструкции картофеля (2-7 сутки), но и значительное время (около 19 суток) после полной деструкции картофеля. Так, даже на 14-16 сутки ежесуточный объем газа составлял 25-31 мл.

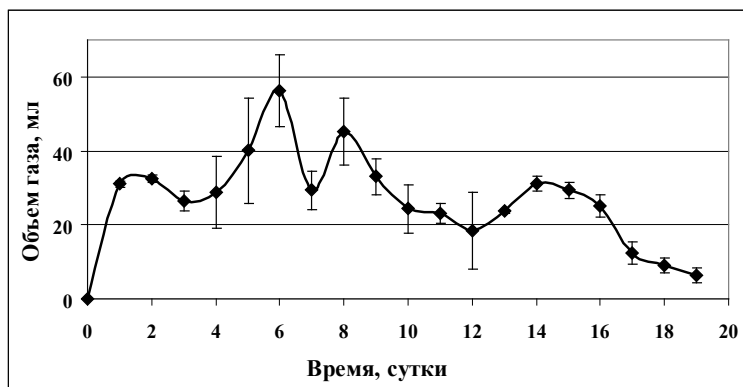


Рис. 2. Динамика синтеза газа ассоциацией микроорганизмов при деструкции картофеля

Хроматографический анализ газа показал, что на 2-3 сутки концентрация водорода составляла 73–75% (рис. 3). Следует отметить, что после 15 суток культивирования общий объем синтезированного газа уменьшился по сравнению с 6 сутками с 56 до 30 мл. Тем не менее концентрация H_2 в газовой смеси была не ниже, чем 60–65% на протяжении всего опыта. Синтез H_2 после полной деструкции картофеля происходил, очевидно, за счет сбраживания растворенных в среде продуктов гидролиза крахмала.

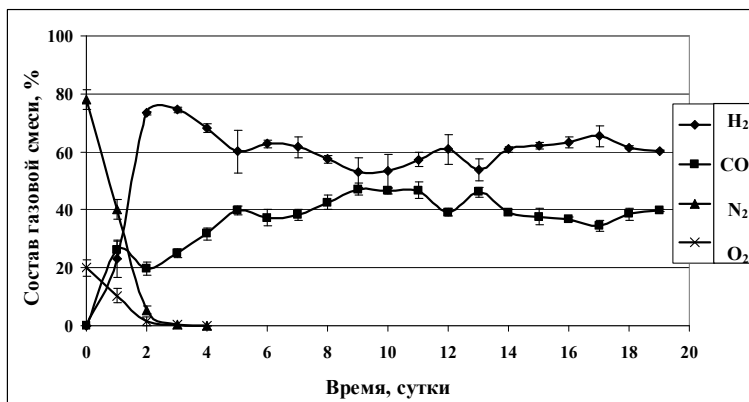


Рис. 3. Изменение состава газовой фазы при деструкции картофеля ассоциацией микроорганизмов

Определенная нами концентрация H_2 в газовой фазе является высокой, т.к., согласно литературным данным, концентрация водорода при микробном брожении колеблется от 30–40% до 70–75% [8].

Максимальный объем H_2 , синтезированного за сутки, составлял около 35 мл (рис. 4). Всего за время эксперимента из 2,62 г АСМ картофеля общий объем синтезированного газа составлял 525,17 мл, а среднее содержание в нем водорода – 59,63%. Следовательно, из 1 кг АСМ картофеля выделенная нами ассоциация синтезирует 119,5 л H_2 .

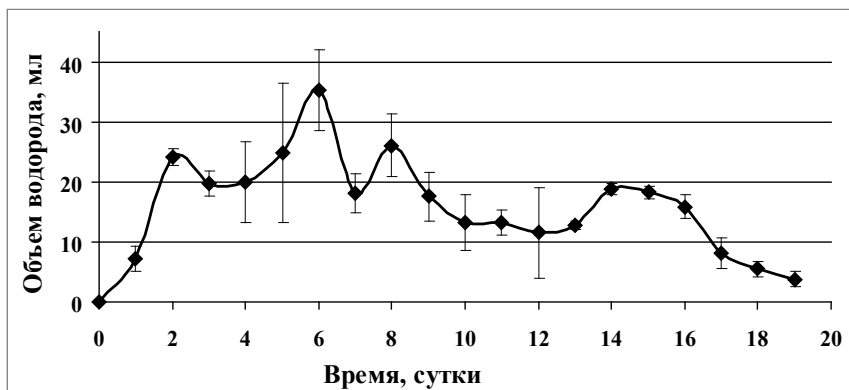


Рис. 4. Динамика синтеза H_2 при деструкции 10 г сырого картофеля ассоциацией спорообразующих микроорганизмов

Результаты микроскопии показали, что ассоциация состоит из прямых палочек различной длины с закругленными концами, палочки часто образуют цепочки из 2-4 клеток. Клетки окрашиваются как грамположительные [2, 4]. При окраске по Граму и специальной окраске для выявления спор по Пешкову, видны преимущественно центральные, реже субтерминальные эллиптические споры, которые сильно раздувают клетки.

После 24 часов культивирования во флаконе (концентрация кислорода в газовой фазе была около 10 %) был сделан высев микроорганизмов в чашки Петри на агаризованную среду с крахмалом и дрожжевым экстрактом. На 5 сутки роста проводили описание колоний и клеток выделенных штаммов. Колонии морфологически и по данным микроскопии (рис. 5) были разделены на 4 типа. Морфолого-физиологические характеристики штаммов представлены в таблице.

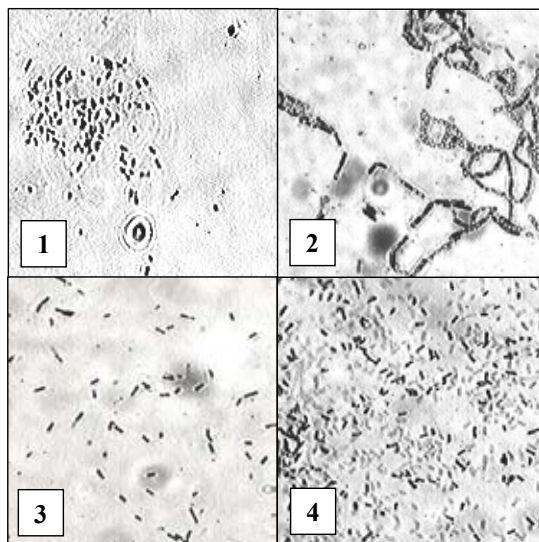


Рис. 5. Типы клеток аэробных спорообразующих бактерий (x1500)

Экспресс-реакция с йодом на чашках с картофельным агаром показала амилазную активность в колониях 2-го и 3-го, и в меньшей мере – 1 типа. Об этом свидетельствовали неокрашенные йодом зоны вокруг ячеек с суспензиями клеток выделенных штаммов. Вокруг колоний 4-го типа неокрашенной зоны не наблюдали.

Нами показано, что гидролиз крахмала также осуществляют анаэробные микроорганизмы. На 5 сутки эксперимента, во время деструкции картофеля и интенсивного синтеза H_2 , пастеризованную культуральную жидкость высевали на агаризованную среду в строго анаэробных условиях по методике Хангейта. Рост нескольких типов колоний после пастеризации посевного материала, и их способность гидролизовать крахмал свидетельствует о наличии в составе ассоциации анаэробных спорообразующих бактерий. Эти бактерии, предположи-

тельно клостридии, благодаря своей способности к спорообразованию, как и бактерии р. *Bacillus*, являются одними из самых распространенных почвенных микроорганизмов [6]. Поскольку бактерии р. *Bacillus* и *Clostridium* образуют термостабильные споры, их ассоциацию можно получить пастеризацией исходного посевного материала, что было нами успешно использовано при ее выделении. Кроме того, наличие эндогенных термостабильных спор у *Bacillus* и *Clostridium* позволяют хранить эти микроорганизмы практически неограниченное время и быстро «активировать» их для запуска промышленной биотехнологии. Возможность термообработки субстрата (например, паром) при их использовании позволяет предотвратить конкурентные процессы потребления синтезированного водорода. Как бациллы, так и клостридии, используют широкий спектр органических соединений в качестве источников углерода и энергии [2]. Многие представители облигатно анаэробных бактерий р. *Clostridium* способны синтезировать H_2 . Использование этих бактерий имеет ряд преимуществ - широкий спектр субстратов, которые сбраживаются с образованием H_2 , и высокая скорость сбраживания. Представители рода *Bacillus* – являются как аэробными, так и факультативно анаэробными микроорганизмами. Например, *Bacillus licheniformis* может расти в анаэробных условиях за счет сбраживания сахаров [3].

Таблица

Морфолого-физиологические характеристики аэробных спорообразующих штаммов

	Штамм 1	Штамм 2	Штамм 3	Штамм 4
Форма и размер колоний	Круглые; мелкие	Неправильные	Неправильные	Круглые; мелкие
Профиль и форма края	Плоский; волнистый	Выпуклый; ровный	Приподнятый; ризоидный	Плоский; ровный
Цвет, блеск, консистенция	Белые; мягкие (маслянистые)	Белые с блеском; вязкие	Белые с блеском; вязкие	Белые; маслянистые
Гидролиз крахмала	+	+	+	-
Форма клеток	Прямые палочки	Прямые палочки	Прямые палочки	Прямые палочки
Расположение	Одиночные	Одиночные и в длинных цепочках	Одиночные	Одиночные
Окраска по Граму	+	+	+	+
Морфология спор	Центральные, эллиптические	Центральные, эллиптические	Центральные эллиптические и субтерминальные цилиндрические	Центральные эллиптические

Также преимущество данной ассоциации состоит в том, что аэробные спорообразующие бактерии (*Bacillus*) начинают рост первыми, удаляют O_2 из жидкой и газовой фазы, снижают редокс-потенциал, тем самым создавая оптимальные условия для дальнейшего роста строго анаэробных H_2 -синтезирующих бактерий р. *Clostridium*.

Таким образом, в настоящей работе на модельном субстрате (картофеле) исследована возможность эффективного синтеза водорода (H_2), при утилизации крупнотоннажных экологически опасных органических полимерных отходов. Полученные нами данные дают нам основания предполагать, что в состав данной ассоциации входят бактерии р. *Clostridium* и *Bacillus*. Целью наших дальнейших исследований является выделение и изучение чистых культур микроорганизмов р. *Bacillus* и *Clostridium* входящих в ассоциацию, а также оптимизация и повышение эффективности синтеза H_2 из органических отходов.

Выводы

1. Выделена ассоциация спорообразующих микроорганизмов, синтезирующая молекулярный водород при сбраживании картофеля. За 7 суток микроорганизмы сбраживают картофель с уменьшением его массы в ~17 раз и синтезируют газ, в котором среднее содержание водорода составляет 60 %.

2. Показано, что из 1 кг высушенного до постоянной массы картофеля можно получить 120 л H_2 . Это свидетельствует о перспективности применения выделенной нами ассоциации

для промышленного получения молекулярного водорода из экологически опасных твердых пищевых отходов.

3. Ассоциация H_2 -синтезирующих спорообразующих бактерий является технологически стабильной и эффективной. Споры бактерий неограниченно долго сохраняют жизнеспособность. В случае контаминации ассоциации при промышленном процессе получения H_2 , нежелательные микроорганизмы устраняются обработкой паром технологической установки, содержащей микроорганизмы вместе со сбраживаемым субстратом.

4. Выделенная ассоциация спорообразующих бактерий может быть использована не только для синтеза молекулярного водорода, но и для обезвреживания экологически опасных пищевых и сельскохозяйственных отходов.

Н.А. Матвеева, А.С. Левішко, І.Р. Притула, А.О. Таширева, П.В. Рокитко, О.Б. Таширев

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

УТВОРЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДНЮ АСОЦІАЦІЄЮ СПОРОУТВОРЮЮЧИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Резюме

Виділена технологічно перспективна мікробна асоціація, що складається з аеробних і анаеробних спороутворюючих бактерій. Асоціація синтезує молекулярний водень при зброджуванні картоплі, а також крохмалю. Асоціація виділена з ґрунту, пастеризованого на киплячій водяній бані. Протягом 5–7 діб асоціація руйнує картоплю зі зменшенням її маси у 17,4 разів і синтезує газ, що на 60 % складається з H_2 .

Ключові слова: мікробний синтез водню, деструкція органічних сполук, спороутворюючі бактерії.

N.A. Matvieieva, A.S. Levishko, I.R. Prytula, A.O. Tashyрева, P.V. Rokitko, O.B. Tashyrev

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

PRODUCING OF MOLECULAR HYDROGEN BY ASSOCIATION OF SPORULATING MICROORGANISMS

S u m m a r y

Technologically promising microbe association, consisting of aerobic and anaerobic sporulating bacteria has been isolated. The association synthesizes molecular hydrogen during fermentation of potato and starch. The association was isolated from soil, pasteurized on the boiling water bath. The association destroys potato during 5-7 days with a decrease of mass up to 17.4 times and synthesizes gas consisting of 60% of H_2 .

The paper is presented in Russian.

K e y w o r d s: microbial synthesis of hydrogen, destruction of organic compounds, sporulating bacteria.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *N.A. Matveeva, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.*

1. Другов Ю.С., Березкин В.Г. Газохроматографический анализ загрязненного воздуха. М.: Химия, 1981, 256 с.
2. Краткий определитель бактерий Берги // Под ред. Хоулта Дж. – М.: Мир, 1980. – 495 с.
3. Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. - М.: Наука, 1981. – 344 с.
4. Сергійчук М.Г. Будова бактеріальної клітини та методи її дослідження. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 232 с.
5. Akutsu Y., Lee D.-Y., Chi Y.-Z., Li Y.-Y., Harada H., Yu H.-Q. Thermophilic fermentative hydrogen production from starch-wastewater with bio-granules // International Journal of Hydrogen Energy. – 2009. – 34, N 12. – P. 5061–5071.

6. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: Volume 3: The Firmicutes / Eds. Vos P. De, Garrity G.; Jones D.; Krieg N.R.; Ludwig W., Rainey F.A.; Schleifer K.-H.; Whitman W.B. – New York: Springer, 2009. – 2nd ed., –XXVI. – 1450 p.
7. *Chen C. C., Lin C. Y.* Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor // *Advances in Environmental Research*. – 2003. – 7, N 3. – P. 695-699.
8. *Guo W.-Q., Ren N.-Q., Wang X.-J., Xiang W.-S., Meng Z.-H., Ding J., QuY.-Y., Zhang L.-S.* Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2008. – 33, N 19. – P. 4981–4988.
9. *Hafez H., Baghchehsaraee B., Nakhla G., Karamanev D., Margaritis A., El Nagggar H.* Comparative assessment of decoupling of biomass and hydraulic retention times in hydrogen production bioreactors // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2003. – 34, N 18. – P.7603–7611.
10. *Kapdan I. K., Kargi F.* Bio-hydrogen production from waste materials // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – 38, N 5. – P. 569–582.
11. *Kim S.-H., Han S.-K., Shin H.-S.* Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2004. – 29, N 15. – P. 1607–1616.
12. *Lin P.-Y., Whang L.-M., Wu Y.-R., Ren W.-J., His C.-J., Li S.-L., Chang J.-S.* Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2007. – 32, N 12. – P. 1728–1735.
13. *Nazlina H.M.Y., Nor Aini A.R., Ismail F., Yusof M.Z.M., Hassan M.A.* Effect of Different Temperature, Initial pH and Substrate Composition on Biohydrogen Production from Food Waste in Batch Fermentation // *Asian Journal of Biotechnology*. – 2009. – 1, N 2. – P. 42–50.
14. *Pan C.-M., Fan Y.-T., Pan Z., Hou H.-W.* Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3 // *International journal of hydrogen energy*. – 2008. – 33, N 20. – P. 5383–5391.
15. *Wang C.C., Chang C.W., Chu C.P., Lee D.J., Chang B.V., Liao C.S.* Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans* // *Journal Biotechnology*. – 2003. – 102, N1. – P.83–92.

Отримано 26.02.2010