

10. *Биопаливо* тверде. Методи визначання гранулометричного складу. Частина 1. Метод з використанням вібраційного решета з отворами 3,15 мм і більше: ДСТУ CEN/TS 15149-1:2009. – К.: Держспоживстандарт України, 2010. – 7 с.

11. *Биопаливо* тверде. Методи визначання вмісту

летких речовин: ДСТУ EN 15148:2012. – К.: Мінекономрозвитку України, 2013. – 6 с.

12. *Древесина* для производства энергии. Технология – окружающая среда-экономика / [Helle Serup (редактор)] / Центр технологий биомассы. – Energistyrelsen Miljø-og Energiministeriet, 1999. – 69 с. – [www.ens.dk](http://www.ens.dk)

УДК 577.23:620.95

Н.Б.Голуб, докт. техн. наук, Д.І.Драпой (НТУУ "КПІ", Київ)

### Отримання водню з відходів кукурудзи та соняшника при збагаченні природної асоціації мікроорганізмів родами *Clostridium* та *Bacillus*

*Досліджено здатність до продукування водню з целюлозовмісної сировини в анаеробному мезофільному ферментативному процесі природних асоціацій мікроорганізмів, які виділено з ґрунту та озера. Показано, що вихід водню залежить від видового складу мікроорганізмів асоціації. Додаткове збагачення природної асоціації одночасно мікроорганізмами родів *Clostridium* і *Bacillus* приводить до суттєвого зниження терміну лаг-фази та підвищення виходу водню в 4 рази у порівнянні з природною асоціацією. За таких умов вміст водню в біогазі підвищується і досягає 85±5%.*

**Ключові слова:** природна асоціація мікроорганізмів, водень, целюлоза, сільськогосподарські відходи, *Clostridium*, *Bacillus*.

*Исследована способность к выделению водорода из целлюлозосодержащего сырья в анаэробном мезофильном ферментативном процессе природных ассоциаций микроорганизмов, выделенных из почвы и озера. Показано, что выход водорода зависит от видового состава микроорганизмов в ассоциации. Дополнительное обогащение природной ассоциации одновременно микроорганизмами родов *Clostridium* и *Bacillus* приводит к существенному снижению срока лаг-фазы и повышению выхода водорода в 4 раза по сравнению с природной ассоциацией. При таких условиях содержание водорода в биогазе повышается и достигает 85±5%.*

**Ключевые слова:** природная ассоциация микроорганизмов, водород, целлюлоза, сельскохозяйственные отходы, *Clostridium*, *Bacillus*.

Більше 80% енергії отримують з викопного палива. Його використання призводить до забруднення навколишнього середовища відходами виробництва, кліматичних змін та швидкого виснаження природних ресурсів, що спонукає спільноту до пошуку відновлюваних екологічно чистих джерел енергії. Таким енергоносієм є водень, сучасні технології одержання якого є енергоємними процесами і потребують, окрім електролізу води та газифікації біомаси, енергетичних викопних ресурсів [1]. Відновлюваною сировиною для отримання водню можуть слугувати відходи сільськогосподарської та харчової промисловості. Ферментативний процес можна проводити в мезофільних або термофільних умовах за використання чистих культур або асоціацій мікроорганізмів. Ефективність продукування водню

мікроорганізмами залежить від співвідношення видів мікроорганізмів у реакторі, оскільки змішані культури можуть створити необхідні комбінації метаболічних шляхів для переробки різних інгредієнтів, що містяться у біоенергетичній сировині, і, відповідно, створити умови до більш ефективного розкладу біомаси, ніж чисті види бактерій [2]. При використанні як чистих культур, так і угруповань мікроорганізмів, з підвищенням температури зростає швидкість деструкції сировини, змінюється метаболізм, зменшується приріст біомаси, розчинність газів CO<sub>2</sub> та H<sub>2</sub> і підвищується вихід водню. Але в термофільних умовах низький приріст біомаси може призвести до зміни метаболізму мікроорганізмів при старінні культури з використанням безперервного процесу, що негативно впливає на вихід водню.

Підвищення температури також призводить до росту енерговитрат і, відповідно, ціни на кінцевий продукт.

За використання чистої культури мікроорганізмів *Clostridium thermocellum* у термофільних умовах при розкладі целюлозних волокон одержано вихід водню 11,2 моль  $H_2$  на кг субстрату [3]. У випадку сумісного використання культури *Clostridium thermocellum* JN4 та *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17 вихід водню з подрібнених стебел та качанів кукурудзи за мезофільних умов складав 16,1-20,4 ммоль  $H_2$ /кг [4]. Використання асоціації мікроорганізмів дозволяє розширити коло сполук субстрату, з яких відбувається продукування водню, підвищити швидкість його утворення та вихід порівняно з чистими культурами [5]. Так, при зброджуванні целюлозовмісних субстратів асоціацією мікроорганізмів з домінуванням родів *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* і *Clostridium* за термофільних умов вихід водню складав 7,22 ммоль  $H_2$ /г карбоксиметилцелюлози при її концентрації 0,25 г/дм<sup>3</sup> [6]. Застосування асоціації мікроорганізмів родів *Enterococcus* та *Clostridium* при зброджуванні соломи пшениці у двостадійному процесі дозволило отримати 79,5 см<sup>3</sup>  $H_2$  на г субстрату [7]. За використання рослинних відходів у мезофільному режимі асоціацією мікроорганізмів, збагаченою *Buttiauxella sp.4*, *Rahnella sp. 10*, *Raoultella sp. 47*, одержано вихід водню 85,65 см<sup>3</sup>  $H_2$ /г [8]. При ферментації целюлозовмісної сировини природною асоціацією мікроорганізмів за мезофільних умов вихід водню складав 61,3 см<sup>3</sup>  $H_2$ /г субстрату за активності целюлози 0,19 ммоль/хв·см<sup>3</sup> [9]. Вихід водню також залежить від складу відходів, методу попередньої підготовки субстрату, його концентрації та умов проведення процесу [10–13]. Тому визначення найбільш продуктивної природної асоціації та родів мікроорганізмів, що приводять до більш повного розкладу целюлозовмісної сировини і підвищеного виходу водню, є актуальною проблемою.

**Мета роботи:** виділення домінуючих родів мікроорганізмів, які підвищують вихід водню з целюлозовмісної сировини. Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні задачі: визначити найбільш ефективну природну

асоціацію мікроорганізмів-деструкторів целюлози і продуцентів молекулярного водню та провести її адаптацію до субстратів; виділити домінуючі роди мікроорганізмів в асоціації; дослідити процес ферментації при збагаченні природної асоціації мікроорганізмами родів *Clostridium* та *Bacillus*.

**Матеріали та методи.** Для отримання асоціації мікроорганізмів-деструкторів целюлози та продуцентів молекулярного водню використовували зразки з ґрунту та мул із озера. Зважування проб проводили за допомогою технічних вагів Т-200.

Для приготування інокуляту вносили 5 г ґрунту в 250 см<sup>3</sup> дистильованої води. Для інактивації метаногенних бактерій суспензію ґрунту протягом години витримували на водяній бані за температури 90°C. Співвідношення інокуляту до культурального середовища становило 1:5 за об'ємом.

Культивування здійснювали у флаконах об'ємом 300 см<sup>3</sup>, заповнених на 70% сумішшю інокуляту, води та відповідним субстратом (4 г), які герметично закривали гумовою пробкою та гвинтовим затискачем. Процес проводили в анаеробних мезофільних умовах при температурі 30-35°C в термостаті сухоповітряному ТС-80М у періодичному режимі. Ступінь анаеробності середовища відстежували за зміною забарвлення розчину резазурину марки х.ч. (0,15 г/дм<sup>3</sup>), який додавали в кількості 1 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>.

Фільтрувальний папір (біла стрічка) використовували як джерело целюлози в контрольному досліді. Для запобігання дефіциту живильних речовин у контрольному зразку до реактора додавали солі у кількості: 0,2 г  $KH_2PO_4$ ; 0,2 г  $NH_4NO_3$ ; 0,1 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,01 г  $CaCO_3$  [14].

Як субстрат використовували суміш відходів кукурудзи та соняшника у співвідношенні 1:1. Для підвищення швидкості процесу утворення водню і доступності живильних речовин відходи попередньо подрібнювали до розмірів 3-5 мм та обробляли 20% розчином NaOH протягом 3 годин. Субстрат промивали дистильованою водою до нейтрального значення рН.

Склад газу, що утворювався у процесі ферментації, визначали методом газової хроматографії за допомогою газового хроматографа ЛХМ-5МД за

стандартною методикою [15]. Коефіцієнти для перерахунку:  $K(H_2)=0,00142$ ;  $K(N_2)=0,0065$ ;  $K(O_2)=0,005$ ;  $K(CO_2)=0,029$ ;  $K(CH_4)=0,0026$ .

Для селекції асоціації мікроорганізмів-деструкторів целюлози та продуцентів водню використовували поживне середовище Омелянського, що містить, г/дм<sup>3</sup>:  $(NH_4)_3PO_4 - 1,0$ ;  $K_2HPO_4 - 1,0$ ;  $MgSO_4 - 0,5$ ;  $NaCl - 0,1$ ;  $CaCO_3 - 2,0$ ;  $FeSO_4 - 2$  краплі 1% розчину; пептон – 0,6; дистильована вода – 1000 см<sup>3</sup> і фільтрувальний папір "біла стрічка" як джерело целюлози.

Для виділення ізольованих колоній анаеробних мікроорганізмів використовували метод посіву мікробіологічною петлею збіднюючим штрихом за стандартною методикою в анаеростаті для роду *Clostridium* та у присутності кисню для роду *Bacillus* [16]. Склад поживного середовища для вирощування колоній містить, г/дм<sup>3</sup>:  $K_2HPO_4 - 30$ ;  $KH_2PO_4 - 2$ ;  $MgSO_4 - 1$ ;  $NH_4Cl - 1$ ;  $CaCO_3 - 0,1$ ;  $FeCl_2 - 0,4$ ; агар – 15; мікрокристалічну целюлозу – 10. Середовище стерилізували автоклавуванням протягом 20 хв при 50,65 кПа, 121°C. Після стерилізації додавали 2 краплі індикатора (резазурину) для візуального контролю окисно-відновного потенціалу середовища. У чашки Петрі з 15 см<sup>3</sup> агаризованого середовища вносили мікроорганізми. Для уникнення утворення конденсату в анаеростат вносили 30-50 г відпаленого (1 год при 100°C) гранульованого ( $d=2-4$  мм) силікагелю. Повітря заміщували на аргон 3-кратним циклом "вакуумування – заповнення аргоном". Аргон, який використовували, (ДСТУ 10157-79, перший сорт) містить  $O_2$  в концентрації не вище 0,002%. Для запобігання контамінації іншими видами мікроорганізмів проводили пересів декілька разів.

Для культивування мікроорганізмів проводили пересівання з чашок Петрі з анаеростату для роду *Clostridium* на середовище Омелянського, для роду *Bacillus* – на м'ясопептонний бульйон.

Морфологію клітин вивчали методами світлової мікроскопії за допомогою мікроскопа XSP-139TP зі збільшенням 1000х. Забарвлення по Граму проводили згідно із загальноприйнятою методикою [14].

**Результати та обговорення.** Для визначення найбільш продуктивної природної асоціації процес ферментації проводили за використання фільтрувального паперу як єдиного джерела карбону. Порівняльна характеристика газової фази, що продукується асоціаціями мікроорганізмів із ґрунту та озера в процесі ферментації, наведена в таблиці 1. Ферментацію починали за наявності повітря у реакторах для пригнічення розвитку метаногенних бактерій-консументів водню. Тому газова фаза містить велику кількість азоту, який утилізується мікроорганізмами дуже повільно, і його відсоток у газовій фазі зменшується за рахунок утворення водню та  $CO_2$ . Кисень у процесі ферментації витрачається на процеси окиснення аеробними, факультативно-аеробними або факультативно-анаеробними мікроорганізмами, які присутні в асоціації. Відсутність кисню в розчині (5 доба для асоціації з ґрунту) також спостерігали за зміною забарвлення резазурину з синього на рожевий. Як видно з табл. 1, зниження концентрації кисню в газовій фазі приводить до підвищення виходу водню. Оскільки у випадку асоціації з озера за період експерименту не відбувалось повної утилізації кисню, то відповідно і розвиток воденьпродукуючих мікроорганізмів був обмежений. Асоціація з ґрунту при максимальному виході водню (6 доба культивування) продукувала його у 2,4 рази більше, ніж асоціація з озера (рис. 1). Зниження виходу водню після 6 доби можна пояснити як зниженням концентрації живильних речовин, так і інгібуванням водню гідрогенази – ферменту, який відповідає за його утворення. Тобто, необхідною умовою для створення технології одержання водню біохімічним шляхом є відведення газової фази із зони реактора. Виходячи з наведених даних, можна констатувати, що найбільш продуктивною асоціацією мікроорганізмів є асоціація з ґрунту.

**Таблиця 1.** Зміна якісного та кількісного складу газової суміші у процесі культивування

Доба культивування	Параметр	Інокулят з озера	Інокулят із ґрунту
3	$H_2$ , %	$0,5 \pm 0,03$	0
	$N_2$ , %	$75 \pm 3,7$	$77,9 \pm 3,9$
	$CO_2$ , %	$20 \pm 1,0$	$16 \pm 0,8$
	$O_2$ , %	$4,5 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,3$
4	$H_2$ , %	$2,7 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$

Доба культивування	Параметр	Інокулят з озера	Інокулят із ґрунту
	N <sub>2</sub> , %	72,8 ± 3,6	75,7 ± 3,7
	CO <sub>2</sub> , %	21 ± 1,0	18,9 ± 0,9
	O <sub>2</sub> , %	3,5 ± 0,1	3 ± 0,1
5	H <sub>2</sub> , %	4,5 ± 0,2	13,5 ± 0,7
	N <sub>2</sub> , %	71 ± 3,6	65 ± 3,2
	CO <sub>2</sub> , %	21,1 ± 1,0	21,5 ± 1,0
	O <sub>2</sub> , %	3,4 ± 0,1	0
6	H <sub>2</sub> , %	14,5 ± 0,7	34,7 ± 1,7
	N <sub>2</sub> , %	61 ± 3,0	42 ± 2,1
	CO <sub>2</sub> , %	23,4 ± 1,1	23,3 ± 1,1
	O <sub>2</sub> , %	1,1 ± 0,05	0
7	H <sub>2</sub> , %	3,5 ± 0,1	18,4 ± 0,9
	N <sub>2</sub> , %	71,3 ± 3,5	56,6 ± 2,8
	CO <sub>2</sub> , %	24,7 ± 1,2	25 ± 1,2
	O <sub>2</sub> , %	0,5 ± 0,03	0

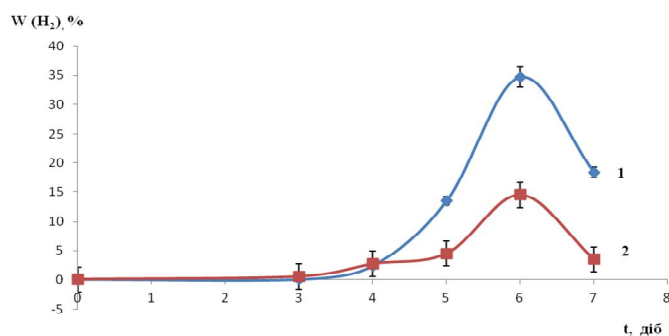
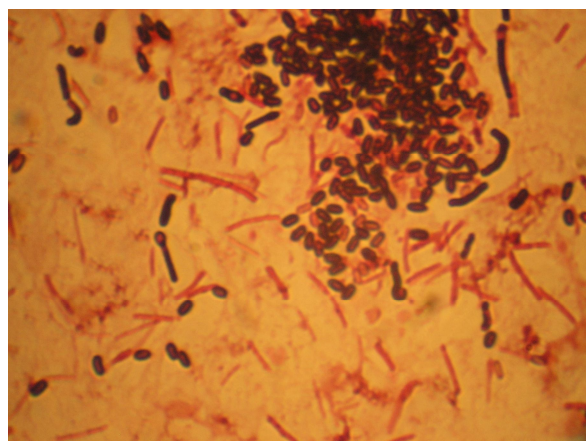


Рис. 1. Зміна виходу водню *W* від часу *t* культивування різних асоціацій мікроорганізмів: 1 – із ґрунту; 2 – з озера.

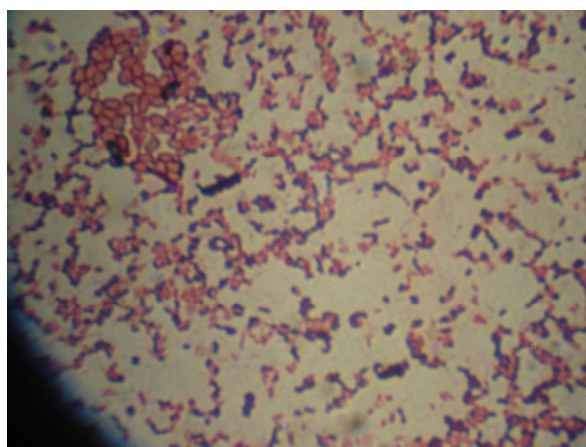
Мікроскопічні дослідження асоціацій показали домінування бактерії роду *Bacillus* з великою кількістю спор в асоціації з озера та роду *Clostridium* в асоціації з ґрунту. Бактерії роду *Bacillus* було виявлено, але в меншій кількості, в асоціації з ґрунту. Домінування мікроорганізмів двох родів *Clostridium* та *Bacillus* сприяє підвищенню виходу водню. Мікроорганізми роду *Bacillus* – факультативно-аеробні бактерії, які використовують розчинений у середовищі кисень для процесу дихання, створюючи анаеробні умови для мікроорганізмів роду *Clostridium* (облігатно-анаеробні), які продукують водень за маслянокислим шляхом. При цьому мікроорганізми роду *Clostridium* мають широкий спектр толерантності до кисню, а мікроорганізми роду *Bacillus* при нестачі кисню в середовищі здійснюють анаеробне бродіння змішаного типу, що також може привести до виділення водню з целюлозовмісної сировини, і відповідно до підвищення виходу водню.

Також перевага асоціації на основі мікроорганізмів родів *Clostridium* та *Bacillus* полягає в тому, що залишок кисню в середовищі приводить до інгібування життєдіяльності метаноутворюючих мікроорганізмів-консументів водню. Припинення процесу метаногенезу, який перебігає одночасно з утворенням водню при ферментації целюлозовмісних відходів, приводить до збільшення виходу водню і є необхідною умовою біотехнології отримання водню.

На рис. 2 представлено фотографії виділених із природних асоціацій колоній представників родів *Clostridium* та *Bacillus*. Для запобігання контамінації іншими видами мікроорганізмів та отримання колонії певного виду з асоціації мікроорганізмів проводили багаторазове пересівання. Ізольовані колонії мікроорганізмів роду *Clostridium* виділяли в анаеростаті, роду *Bacillus* – на твердому поживному середовищі за присутності кисню.



а



б

Рис. 2. Колонії виділених мікроорганізмів родів: а – *Clostridium* з термінально та субтермінально розташованими спорами; б – *Bacillus* зі спорами.

Нарощування біомаси виділених колоній проводили на рідкому поживному середовищі Омелянського для мікроорганізмів роду *Clostridium* і м'ясопептонному бульйоні для мікроорганізмів роду *Bacillus*.

У таблиці 2 наведено склад біогазу, що утворюється в процесі ферментації відходів кукурудзи та соняшника за використання збагаченої мікроорганізмами родів *Clostridium* та (або) *Bacillus* асоціації мікроорганізмів із ґрунту. Для збагачення природної асоціації у реактор додатково вносили 20 см<sup>3</sup> інокуляту з мікроорганізмами роду *Clostridium* та 50 см<sup>3</sup> роду *Bacillus*.

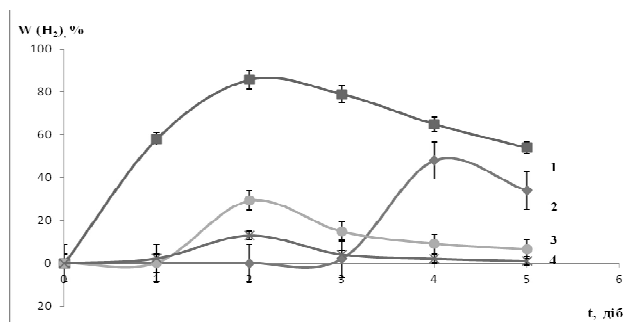
Як видно з таблиці 2, додаткове збагачення природної асоціації мікроорганізмами тільки роду *Clostridium* або *Bacillus* призводить до зменшення терміну лаг-фази (рис. 3) та виходу водню в порівнянні з природною асоціацією. Зниження продуктування водню мікроорганізмами, збагаченими одним видом асоціації, можна пояснити руйнуванням трофічних зв'язків і, як наслідок, зменшенням швидкості ферментації складних субстратів, збільшенням кількості метаболітів, які призводять до інгібування процесу продуктування водню, зміною ферментативних шляхів із

біосинтезу водню на інший тип бродіння. Тобто домінування одного роду мікроорганізмів призводить до зменшення виходу водню. Натомість, при внесенні в природну асоціацію одночасно мікроорганізмів обох родів *Clostridium* та *Bacillus* вихід водню збільшується (табл. 2, рис. 3). При цьому зникає лаг-фаза або її термін значно зменшується (рис. 3), про що свідчить вміст водню у біогазі на рівні 58% через добу після запуску процесу ферментації. Тобто симбіоз мікроорганізмів двох родів у співвідношенні 1:2,5 відповідно приводить до підвищення швидкості продуктування водню за анаеробних умов у 2 рази (2 доба для збагаченої асоціації і 4 доба для природної). Це пояснюється тим, що бактерії роду *Bacillus* у процесі своєї життєдіяльності створюють необхідні умови для анаеробного процесу целюлозного бродіння за участі мікроорганізмів роду *Clostridium*.

Підвищення ефективності процесу утворення водню у ферментативному процесі при збагаченні природної асоціації мікроорганізмами родів *Clostridium* та *Bacillus* дозволяє скоротити час ферментації сировини, підвищити вміст енергоносія в біогазі, що робить процес отримання водню енергоефективним.

Таблиця 2. Склад біогазу при збагаченні природної асоціації мікроорганізмами родів *Clostridium* і *Bacillus*

Доба культивування	Речовина	Природна асоціація	Природна асоціація збагачена <i>Clostridium</i>	Природна асоціація збагачена <i>Bacillus</i>	Природна асоціація збагачена <i>Clostridium</i> та <i>Bacillus</i>
1	H <sub>2</sub> , %	0	0,2 ± 0,01	2,3 ± 0,1	58,1 ± 2,9
	N <sub>2</sub> , %	49,5 ± 2,5	24,4 ± 1,2	49,1 ± 2,5	35 ± 1,7
	O <sub>2</sub> , %	10,75 ± 0,5	3,4 ± 0,1	10,9 ± 0,5	2,1 ± 0,1
2	H <sub>2</sub> , %	0,2 ± 0,01	29,3 ± 1,4	12,9 ± 0,6	85,7 ± 4,3
	N <sub>2</sub> , %	59,5 ± 2,9	50,3 ± 2,5	45,6 ± 2,3	11 ± 0,5
	O <sub>2</sub> , %	6,8 ± 0,3	0	0	0
3	H <sub>2</sub> , %	2 ± 0,1	14,8 ± 0,7	4,1 ± 0,2	79 ± 3,9
	N <sub>2</sub> , %	61 ± 3,0	57 ± 2,8	53,2 ± 2,7	14 ± 0,7
	O <sub>2</sub> , %	2,3 ± 0,1	0	0	0
4	H <sub>2</sub> , %	48 ± 2,4	9,1 ± 0,4	2,1 ± 0,1	65 ± 3,2
	N <sub>2</sub> , %	46 ± 2,3	61 ± 3,0	55,1 ± 2,7	21 ± 1,0
	O <sub>2</sub> , %	0	0	0	0
5	H <sub>2</sub> , %	34 ± 1,7	6,5 ± 0,3	1,1 ± 0,05	54 ± 2,7
	N <sub>2</sub> , %	52 ± 2,6	64 ± 3,2	57 ± 2,8	32 ± 1,6
	O <sub>2</sub> , %	0	0	0	0



**Рис. 3.** Зміна виходу водню *W* у процесі культивування:  
 1 – асоціація збагачена *Clostridium* і *Bacillus*;  
 2 – природна асоціація; 3 – асоціація збагачена *Clostridium*;  
 4 – асоціація збагачена *Bacillus*.

**Висновки.** 1. Вихід водню в анаеробному процесі ферментації целюлозовмісної сировини залежить від видового складу мікроорганізмів в асоціації. Найбільш ефективною природною асоціацією для отримання водню з сільськогосподарських відходів є асоціація мікроорганізмів із ґрунту, в якій домінуючими є мікроорганізми роду *Clostridium*.

2. Збагачення природної асоціації мікроорганізмами родів *Clostridium* та *Bacillus* у співвідношенні 1:2,5 приводить до інтенсифікації процесу ферментації та збільшення виходу водню в 4 рази, а також до скорочення терміну лаг-фази, що приводить до підвищення енергоефективності процесу. За таких умов вміст водню в біогазі досягає 85±5%.

1. Zittel W., Wurster R. Hydrogen in the Energy Sector // *Int. J. Hydrogen Energy* – 2006. – V. 8. – № 3. – P. 322–337.

2. Hung C-H., Chang Y-T., Chang Y-J. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review // *Bioresource Technol.* – 2011. – V. 102. – № 18. – P. 8437–8444.

3. Moreau A., Montplaisir D., Sparling R., Barnabé S. Hydrogen, ethanol and cellulase production from pulp and paper primary sludge by fermentation with *Clostridium thermocellum* // *Biomass and Bioenergy*. – 2015. – V. 72. – № 11. – P. 256–262.

4. Liu Y., Yu P., Song X., Qu Y. Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4

and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17 // *Int. J. Hydrogen Energy*. – 2008. – V. 33. – № 5. – P. 2927–2933.

5. Pachapur V.L., Sarma, S.J. Bra S.K., Le Bihan Y., Buelna G., Verma M. Biological hydrogen production using co-culture versus mono-culture system // *Environmental Technology*. – 2015. – V. 138. – № 15. – P. 2225–2232.

6. Saripan A.F., Reungsang A. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose for bio-hydrogen production by anaerobic mixed cultures in elephant dung // *Hydrogen Energy*. – 2014. – V. 39. – № 17. – P. 9028–9035.

7. Valdez-Vazquez I., Pérez-Rangel M., Tapia A., Buitrón G., Molina C., Hernández G., Amaya-Delgado L. Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium* // *Fuel*. – 2015. – V. 159. – № 13. – P. 214–222.

8. Marone A., Massini G., Patriarca C., Signorini A. Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities // *Int. J. Hydrogen Energy*. – 2012. – V. 37. – № 7. – P. 5612–5622.

9. Xueqing S., Dong-Hoon K., Hang-Sik S., Kyung-Won J. Effect of temperature on continuous fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* by anaerobic mixed cultures // *Bioresource Technology*. – 2013. – V. 144. – № 3. – P. 225–231.

10. Chong P.S., Jahim J.M., Harun S., Lim S.S. Enhancement of batch biohydrogen production from prehydrolysate of acid treated oil palm empty fruit bunch // *Int. J. Hydrogen Energy*. – 2013. – V. 38. – № 22. – P. 9592–9599.

11. Голуб Н.Б. Влияние концентрации субстрата на образование водорода в процессе ферментации // *Альтернативная энергетика и экология*. – 2014. – №15. – С. 107–113.

12. Hung C-H., Chang Y-T., Chang Y-J. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review // *Bioresource Technol.* – 2011. – V. 102. – № 18. – P. 8437–8444.

13. Siriporn Y., Sompong O-T., Poonsuk P. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities // *Int. J. Hydrogen Energy*. – 2012. – V. 37. – № 18. – P. 13806–13814.

14. Непрысов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. – М.: Издательский центр "Академия", 2005. – 608 с.

15. Хроматоргаф лабораторный ЛХМ-8МД: техническое описание инструкция по эксплуатации / Опытный завод "Хроматоргаф". – Москва, 1992. – 50с.

16. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 2006. – 720с.