КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени К.И. САТПАЕВА

**Косалбаев Б.Д., Садвакасова А.К., Заядан Б.К.**

# ФОТОТРОФНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ

Алматы, 2022

УДК 577.23 (075.8)
ББК 28.071.12 я73
К 71

Рекомендовано к изданию УС и УМС института геологии
и нефтогазового дела имени К. Турысова
(Протокол № 8 от 25.04.2022)

**Рецензенты:**
Доктор PhD Амитова А.А., Доктор PhD Алмуратова Н.К.

Издана за счет грантов МОН РК AP09260077 «Исследование биотехнологического потенциала отечественной коллекции микроводорослей для получения жидкого топлива - биобутанола»; AP13067574 «Повышение активности продуцирования водорода штаммами цианобактерий методами генной инженерии»; AP09260785 «Разработка технологии получения биоводорода на основе перспективных штаммов цианобактерий для производства биотоплива».

**Косалбаев Б.Д., Садвакасова А.К., Заядан Б.К.**
**К 71 Фототрофные микроорганизмы в биоэнергетике**: Монография. – Алматы, 2022

*Монография посвящена проблеме поиска альтернативных источников энергии и различным аспектам применения биомассы фототрофных микроорганизмов в качестве сырья для получения биотоплива. В книге анализируются возможности микроводорослей и цианобактерий в биоэнергетике, приводятся методы и условия получения биотоплива на их основе. Исследовано влияние различных стрессовых факторов на энергетическую продуктивность микроводорослей. Описан биотехнологический потенциал фототрофных микроорганизмов в получении жидких (биодизель, биоэтанол, биобутанол) и газообразных (биоводород) видов топлив. Издание адресовано специалистам в области биотехнологии, энергетики и экологии, для студентов, магистрантов и докторантов биологических и технических специальностей высших учебных заведений.*

ISBN 978-601-323-295-9 © Издательство «Polytech», 2022 ж.

## Содержание


| | | |
|---|---|---|
| | Введение..... | 5 |
| **1** | **Получение биодизеля с помощью микроводорослей.....** | **7** |
| 1.1 | Потенциал цианобактерий в получении биодизеля..... | 8 |
| 1.2 | Эффективность используемых подходов в получении липидов из биомассы фототрофных микроорганизмов..... | 44 |
| 1.3 | Перспективы и проблемы производства биодизеля на основе фототрофных микроорганизмов..... | 54 |
| **2** | **Получение биоводорода на основе цианобактерий.....** | **72** |
| 2.1 | Биопроцессы образования водорода клетками цианобактерий с использованием световой энергии..... | 74 |
| 2.2 | Возможные пути увеличения выделения водорода клетками цианобактерий..... | 91 |
| 2.3 | Метаболические подходы увеличения выхода водорода клетками цианобактерий..... | 92 |
| 2.4 | Генетические подходы увеличения выхода водорода клетками цианобактерий ..... | 123 |
| 2.5 | Технологические подходы увеличения продукции водорода у цианобактерий..... | 128 |
| 2.6 | Тенденции и перспективы развития производства биоводорода на основе цианобактерий ..... | 138 |
| 2.6.1 | Политические меры, определяющие развитие биоводородной энергетики..... | 138 |
| 2.6.2 | Технико-экономический анализ получения биоводорода цианобактериями..... | 141 |
| 2.6.3 | Практическая значимость исследований в данной области..... | 146 |
| 2.6.4 | Методы получения водорода из фототрофных микроорганизмов..... | 153 |
| **3** | **Получение спиртовых топлив на основе микроводорослей.....** | **174** |

**4 Массовое культивирование фототрофных микроорганизмов..... 205**
4.1. Физиологические и технологические факторы, влияющие на рост клеток..... 205
4.1.1 Свет для культивирования..... 207
4.1.2 Температура для культивирования..... 209
4.1.3 Питательные вещества ..... 211
4.1.4 Аэрация и перемешивание..... 212
4.1.5 pH и соленость при культивировании..... 213
4.1.6 Миксотрофное выращивание ..... 214
4.2 Фотобиореакторы..... 214
4.3 Открытые пруды..... 217
**5 Возможности создания мало- и безотходных технологий на основе микроводорослей в биоэнергетике..... 237**
5.1 Утилизация $CO_2$ фототрофными микроорганизмами..... 241
5.2 Применение сточной воды для культивирования цианобактерий..... 245
**Приложение 1.**
Состав питательных сред для выращивания цианобактерий и инструкции по их приготовлению..... 277
**Приложение 2.**
Фотографии фототрофных микроорганизмов, имеющих значение в биоэнергетике..... 288
**Приложение 3.**
Фотогалерея сотрудников лаборатории биотехнологии фототрофных микроорганизмов..... 293

## Введение

Последние десятилетия характеризуются снижением имеющихся запасов нефти, истощением старых источников и сложностью освоения новых ее месторождений, что вызывает нестабильность цен на углеводородное сырье и соответственно необходимость поиска альтернативных источников энергии. Кроме этого, более важной проблемой является необходимость снижения выбросов «парникового газа» в атмосферу, возникающее в результате антропогенной деятельности, в том числе воздействия ископаемого топлива. Всем известно, что парниковый эффект, представляя собой нарушение климатического равновесия Земли, приводящее к глобальному потеплению, чреват катострофическими губительными последствиями для всего живого на планете в уже недалеком будущем. В связи с этим, необходимость принятия мер, направленных на сокращение выбросов парниковых газов стимулирует внедрение альтернативных «зеленых» технологий и развитие новой отрасли промышленности — биоэнергетики, рассматриваемого, как ключевой элемент в деятельности по смягчению последствий изменения климата. В данном контексте биомасса для производства энергии может сыграть ключевую роль, так как является легко возобновляемым ресурсом и позволяет значительно сократить выбросы парниковых газов по сравнению с ископаемым топливом.

Фототрофные микроорганизмы — одна из больших групп микроорганизмов, в которую входят фототрофные прокариоты (пурпурные, зеленые, гелиобактерии, цианобактерии, галобактерии и прохлорофиты) и фототрофные эукариоты (микроформы различных видов водорослей). Цианобактерии и микроводоросли используя энергию света, синтезируют различные клеточные вещества и обладают большим потенциалом в биотехнологии и в том числе в биоэнергетике.

Монография включает 5 разделов, рассматривающих потенциал цианобактерий и микроводорослей в получении таких видов биотполива как биодизель, биобутанол, биоэтанол и биоводород, а также рассматривает условия их культивирования и возможности создания на их основе мало- и безотходных

технологий в биоэнергетике. Книга включает как результаты собственных исследований исследовательской группы так и материалы литературы в данной области со списком использованных источников.

Теоретический материал и методы, изложенные в монографии, могут быть широко использованы студентами, аспирантами и научными работниками, занимающимися выращиванием, хранением и переработкой биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов в биоэнергию.

# 1. ПОЛУЧЕНИЕ БИОДИЗЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

В настоящее время мировое потребление нефти составляет около 11,6 млн тонн в сутки, в связи с этим, подземных ресурсов ископаемой нефти хватит лишь на несколько десятилетий [1]. Многие исследователи предполагают, что уменьшение добычи нефти будет отмечаться начиная с 2030-х годов, что повлечет за собой кризис, вызванный дефицитом энергии [2]. Поэтому в настоящее время ведется поиск экономически выгодного, неисчерпаемого источника энергии, способного заменить сырую нефть, во избежании возниконовения мирового экономического кризиса. Кроме того, сжигание ископаемого топлива приводит к большому выбросу парниковых газов, что, в свою очередь, приводит к необратимому изменению климата [3]. По прогнозам климатологов, к 2040 году парниковые газы вырастут примерно до 43 миллиардов метрических тонн [4-5]. Таким образом, необходимы дополнительные энергетические ресурсы, которые возобновляемы и легко доступны. В связи с этим, изучение возможностей замены ресурсов ископаемого топлива альтернативной энергией является важной областью научных исследований. Биотопливо среди других альтернативных возобновляемых источников энергии рассматривается как заменитель нефти из-за его нетоксичной, не содержащей серы, биологически разлагаемой природы, происходящей из возобновляемых источников.

На сегодняшний день, биотопливо, полученное на основе биомассы фототрофных микроорганизмов, являются сравнительно новой областью исследований. Производство биотоплива из биомассы фототрофных микроорганизмов могут быть не только экономически эффективной, но и экологически устойчивой технологией с минимизацией образования отходов в процессе использоваия [6-12]. За последние 30 лет цианобактерии интенсивно изучались в производстве биотоплива, особенно рассматривались способности их клеток к продуцировать липиды и быстрому накоплению биомассы в результате фотосинтеза [13-19]. При этом липиды цианобактерий считаются постоянной и потенциальной

альтернативой традиционному биотопливу [20]. По сравнению с липидами водорослей и растений, представленными в основном триацилглицеринами, липиды цианобактерий довольно разнообразные, поскольку состоят из диацилглицеринов, расположенные в больших мембранных системах клетки, как тилакоидные мембраны и фотосинтетические мембраны. Их липидные компоненты в основном состоят из нейтральных галактолипидов [21-26]. В рамках определенного класса липидов, виды липидов цианобактерий могут различаться по количеству атомов углерода в жирном ацильном заместителе и уровню насыщенности [27]. Учитывая возможности фотосинтеза на планете, основные их глицеролипиды, являясь самыми распространенными, привлекают широкое внимание исследователей и имеет большой потенциал в производство биотоплива.

Учитывая вышеизложенное, необходимо отметить высокую актуальность исследований возможностей цианобактерий в преобразовании отходов (сточные воды, $CO_2$) в биотопливо. В целом в литературе имеется много различных обзорных и экспериментальных статей, посвященных получению биотоплива на основе фототрофных микроорганизмов, однако, стремительное развитие науки в области биоэнергетики требует анализа современного состояния научных данных в данной области и их систематизации.

### 1.1. Потенциал цианобактерий в получении биодизеля

Ключевую роль в производительности любого биологического продукта, в том числе и биотоплива несомненно играет правильный выбор подходящего объекта. Как правило, микроорганизмы, представляющие интерес в качестве сырья для биотоплива выбираются на основе ряда свойств, которые включают естественную способность производить интересующее топливо либо основное сырье для его получения, высокая продуктивность, активный рост, способность расти на дешевых средах, способность поддаваться различным метаболическим и генетическим манипуляциям для улучшения их свойств. Все это предопределяет возможность их промышленного применения.

Так способность естественным образом интенсивно накапливать необходимые жирные кислоты и использовать солнечный свет в качестве «исходного сырья» делает цианобактерии наряду с водорослями перспективными объектами для производства биодизеля.

Также как и микроводоросли, они, являясь экологически чистым и высокопроизводительным сырьем для производства биодизеля, признаны одними из наиболее потенциально подходящих объектов, используемых для получения биотоплива третьего поколения. При этом, если сравнивать их с некоторыми растительными объектами, являющимися источниками топлива первого поколения, фототрофные микроорганизмы способны генерировать почти в 30 раз больше энергии на акр. А учитывая их главное преимущество перед растениями, такое, как отсутствие конкуренции в качестве источника продовольствия, они могут быть одними из потенциальных субстратов производства биоэнергии на сегодняшний день. Использование продовольственных культур, в качестве исходного сырья для производства биотоплива уже нерентабельно в связи с использованием сельскохозяйственных угодий для их выращивания и конкуренцией в пищевой промышленности. Поэтому цианобактерии как самые древние, быстрорастущие и высокоэнергетические культуры, могут стать основой для крупнотоннажного производства биотоплива, тем самым создав базу для устойчивого развития энергетики будущего. При этом современные каталитические методы открывают широкие возможности для переработки биомассы цианобактерий в различные продукты. Так, из их биомассы можно получить различные виды биотоплив: жидкое (биодизель, биобутанол, биоэтанол, бионефть) и газообразное (метан, биоводород). В последние годы внимание исследователей все больше акцентируется на использовании биомассы цианобактерий, активно накапливающих липиды при производстве биодизеля [20-22].

Кроме того необходимо отметить, что отходы биомассы цианобактерий после извлечения липидов для производства биодизеля, можно использовать для получения других видов биотоплив. Так, например, отходы биомассы богатые

углеводами могут быть хорошим сырьем для сбраживания и получения спиртосодержащих топлив, таких как биоэтанол и биобутанол (рисунок 1). Это также подчеркивает большой потенциал цианобактерий и целесообразность применения их биомассы в биоэнергетике, учитывая общемировые тенденций развития различных мало и безотходные технологий, являющихся на сегодняшний день одними из важных трендов.

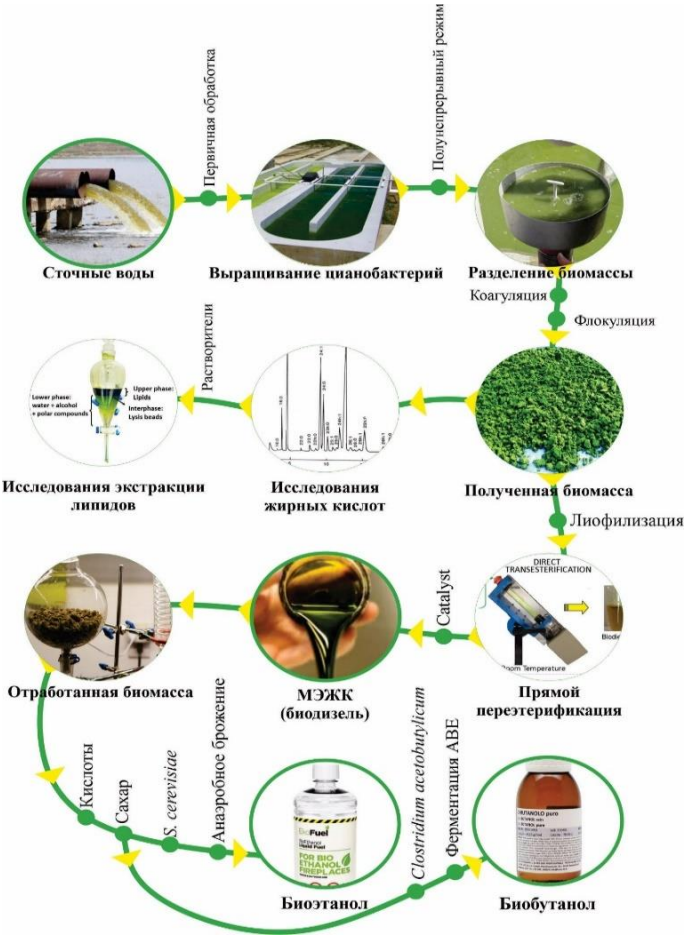



Рис.1. Схема получения биотоплива из цианобактерий

Для успешного культивирования микроводорослей в производстве и использования выделенных штаммов в биоэнергетике, а точнее в получении на их основе биодизеля, необходим подбор высокопродуктивных видов. Как известно, многие из них являются весьма перспективными продуцентами липидов и жирных кислот кроме того характеризуются высокой скоростью роста на простых средах [15]. При этом известно, что повышенный синтез и аккумуляция липидов это видовая или даже штаммовая специфичность. Жирнокислотный состав липидов морских водорослей характеризуется наличием соединений насыщенного и ненасыщенного ряда. Например, в изученных японскими авторами липидах морской водоросли *Cystophyllum hakodatense* определяются кислоты миристиновая (4,5%), пальмитиновая (18%), гексадеценоевая (16%), гексадекатетраеновая (7%), октадеценоевая (39%), октадекадиеноевая (3%), октадекатриеноевая (1%), октадекатетраеновая (7%), докозадиеновая (1%), докозатриеновая (3%). Значительное количество липидов, включающих как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты, содержат планктонные водоросли, отличающиеся также разнообразием положения двойных связей в углеродной цепи. У диатомовой водоросли *Sceletonema costatum*, характеризующейся относительно высокой концентрацией свободных жирных кислот, последние представлены соединениями, содержащими в основном 2, 3, 4 двойные связи. Обычными, как свидетельствуют литературные данные, для жирных кислот липидов диатомовых водорослей является 2, 3, 4, 5, 6 двойные связи с числом углеродных атомов в линейной цепи 18, 20 и 22. Общее содержание липидов достигает 30% и более от сухого веса диатомовых водорослей.

Использование пресной воды для массового культивирования цианобактерий и водорослей является непрактичным подходом из-за растущих потребностей водных ресурсов в будущем. Многоцелевое применение фототрофных микроорганизмов для очистки сточных вод с целью биоремедиации и получения дешевой биомассы для производства биотоплива и высокоценных химических веществ может значительно повлиять на снижение стоимости

питательных веществ необходимых для их культивирования, пресноводных ресурсов и энергии. Это связано с тем, что сточные воды содержат все химические вещества, необходимые для роста цианобактериальных клеток, и их выращивание не представляет особой сложности. Результаты исследований в этой области были широко показаны в работах Bolatkhan и другие (2019). Авторами показаны возможности штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 в очистке сточной воды, процент очистки органических загрязнений и улучшения физико-химических показателей воды составил 68-100 % при соотношении сточной воды к питательной среде 75:25 соответственно. Содержание липидов в биомассе исследованного штамма составило 22 % от сухого веса биомассы [27].

*Накопление липидов и жирнокислотный профиль цианобактерий.*

Цианобактерии являясь источниками липидов, три - и диглицеридов, фосфолипидов, гликолипидов, рассматриваются как важные объекты в биотехнологиии и биоэнергетике.

В настоящее время в отношении накопления липидов хорошо изучены виды *Synechocystis, Anabaena, Synechococcus, Oscillatoria* и *Spirulina* [28]. Они обладают способностью накапливать значительные количества триацилглицерида (ТАГ) в качестве запасного липида (от 20 до 50% от сухой массы клетки) в условиях фотоокислительного стресса или других стрессовых условиях окружающей среды и в зависимости от вида.

Так, недавние исследования показали, что продукция липидов штаммом *Synechocystis* PCC6803 составила 12,5% [5]. Приводятся сведения о достаточно большом количестве липидов в клетках цианобактерий *Oscillatori* sp. 31,9%), *Synechococcus* sp. (30,6%), *Croococcidiopsis* sp. (22,7%), *Leptolyngbya* sp. (21,15 %), *Limnothrix* sp. (20,73 %) [28]. Hossain и другие (2020) зарегистрировали накопление липидов в количестве 10,8% для штамма *Oscillatoria* sp. выделенного с рисового поля [29]. Uma и другие (2016) выделили два вида нитчатых цианобактерий, изучили их жирнокислотный состав и определили липидную продуктивность у *Spirulina subsalsa* BDU 141201 и *Oscillatoria willei* BDU 130791 (16,2 и 15,9 %

соответсвенно) [20]. Palanisamy и другие (2020) установили высокое накопление липидов до 34,5% для Spirulina *platensis*, которое после световой оптимизации было увеличено до 35,8% [30]. Han и другие (2016) оптимизировали штамм *Anabaena variabilis* для производства липидов, достигнув ее продуктивности до 46,9% [31]. В таблице 1 ниже приведены некоторые данные о штаммах цианобактерий характеризующихся интенсивным накоплением липидов.

Таблица 1. Содержание липидов в биомассе некоторых штаммов цианобактерий

| Штаммы | Виды цианобактерии | Содержание липидов, % от биомассы | Литература |
|---|---|---|---|
| *Oscillatoria* sp. U-55 | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 31.9 | 29 |
| *Synechococcus* sp. U-10 | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 30.6 | |
| *Croococcidiopsis* sp. U-16 | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 22.7 | |
| *Leptolyngbya* sp. U-1 | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 21.1 | |
| *Limnothrix* sp. U-67 | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 20.7 | |
| *Calothrix* sp. | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 18.1 | |
| *Nostoc* sp. | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 15.4 | |
| *Cephalothrix Komarekiana* U-41 | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 13.8 | |
| *Westiellopsisprolifica* U-58 | Нитчатые цианобактерии с акинетами | 12.8 | |
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | Одноклеточные цианобактерии | 35,9 | 32 |
| *Dolichospermum* affine | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 10.67 | 33 |
| *Nostoc* sp. MCC4 | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 15.7 | 34 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Nostoc* sp. (g17) | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 9.6 | |
| *Nostoc* sp. (g15) | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 9.8 | |
| *Nostoc* muscorum | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 8.4 | |
| *Nostoc* calcicola | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 6.5 | |
| *Anabaena* sp. (g24) | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 16.1 | |
| *Anabaena* sp. (g19) | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 9.8 | |
| *Anabaena doliolum* | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 9 | |
| *Tolypothrix* sp. | Нитчатые цианобактерии с акинетами | 7.7 | |
| *Synechocystis* sp. | Одноклеточные цианобактерии | 3.6 | |
| *Westiellopsis* sp. | Нитчатые цианобактерии с акинетами | 9.3 | |
| *Oscillatoria pseudogeminata* | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 15 | 35 |
| *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 | Одноклеточные цианобактерии | 23,1 | 27 |
| *Synechococcus* sp. MK568070 | Одноклеточные цианобактерии | 21,4 | 36 |
| *Synechococcus* sp. MK568070 | Одноклеточные цианобактерии | 21,4 | 36 |
| *Synechococcus* sp. PCC 7942 | Одноклеточные цианобактерии | 6,13 | 37 |
| *Synechococcus* sp. (MK568070) | Одноклеточные цианобактерии | 41 | 37 |
| *Cyanobium* sp. BG-11 | Одноклеточные цианобактерии | 5,48 | 38 |
| *Limnothrix* sp. ASM-1 | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 9,12 | |
| *Limnothrix* sp. BG-11 | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 7,87 | |
| *Nostoc* sp. BG-11 | Негетероцистные | 0.43 | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | нитчатые цианобактерии | | |
| *Nostoc* sp. ASM-1 | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 1.74 | |
| *Cyanobium* sp. ASM-1 | Одноклеточные цианобактерии | 1.59 | |
| *Synechocystis* sp. | Одноклеточные цианобактерии | 45,02 | 39 |
| *Microcystis novacekii* | Одноклеточные цианобактерии | 31,7 | 40 |
| *Microcystis aeruginosa* | Одноклеточные цианобактерии | 23,3 | 40 |
| *Microcystis panniformis* | Одноклеточные цианобактерии | 35,8 | 40 |
| *Microcystis protocystis* | Одноклеточные цианобактерии | 41,5 | 40 |
| *Synechocystis* sp. NN | Одноклеточные цианобактерии | 19,3 | 41 |
| *Synechocystis* PCC 6803 | Одноклеточные цианобактерии | 13,1 | 2 |
| *Synechococcus* PCC 7942 | Одноклеточные цианобактерии | 11,0 | |
| *Nostoc muscorum* | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 7,5 | |
| *Oscillatoria* sp. | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 8,9 | |
| *Anabaena cylindrica* | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 4,8 | |
| *Lyngbya* sp. | Одноклеточные цианобактерии | 10,3 | |
| *Phormidium* sp. | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 8,4 | |
| *Anabaena variabilis* | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 37,8 | 31 |
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | Одноклеточные цианобактерии | 10 | 42 |
| *Spirulina platensis* | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 65 | 43 |
| *Synechococcus* sp. PCC7942 | Одноклеточные цианобактерии | 29 | 44 |
| *Synechocystis* sp. | Одноклеточные | 45,5 | 45 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| PCC6803 | цианобактерии | | |
| *Microcystis* sp | Одноклеточные цианобактерии | 28 | 46 |
| *Phormidium* sp. | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 15 | |
| *Synechocystis* PCC 6803 | Одноклеточные цианобактерии | 13 | 47 |
| *Synechococcus elongatus* | Одноклеточные цианобактерии | 17,7 | 48 |
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | Одноклеточные цианобактерии | 18,4 | 48 |
| *Arthrospira platensis* | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 13,2 | 49 |
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | Одноклеточные цианобактерии | 32,5 | 32 |
| *Synechocystis* spp. (U) | Одноклеточные цианобактерии | 50 | 50 |
| *Phormidium* sp. | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 11 | 51 |
| *Calothrix crustacea* | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 71 | |
| *Calothrix contanerii* | Гетероцистные нитчатые цианобактерии | 64 | |
| *Limicolaria martensiana* | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 76 | |
| *Phormidium corium* | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 34 | |
| *Oscillatoria formosa* | Негетероцистные нитчатые цианобактерии | 32 | |

Однако необходимо отметить, что важным моментом при выборе видов цианобактерий для производства биодизеля является не только высокая липидная продуктивность, но и правильный профиль жирных кислот. Важным параметром, определяющим качество биодизельного топлива, является состав сложных эфиров жирных кислот, структура которых влияет на ключевые свойства биотоплива, особенно на его цетановое число, температуру воспламенения, вязкость,

окислительную стабильность, текучесть при низких температурах [52]. Биотопливо, содержащее соединения с большим количеством насыщенных связей, характеризуется более высокой устойчивостью к окислению, при его сжигании полимеризации глицерина не происходит, что значительно повышает надежность двигателей [53]. Поэтому к жирнокислотному составу липидов цианобактерий, как потенциальных производителей биодизельного топлива предъявляются такие требования, как высокое содержание насыщенных жирных кислот и низкое количество полиненасыщенных жирных кислот. Среди жирных кислот важное значение для производства биодизеля имеют химические составы C10: 0, C16: 1 и C18: 1.

Исследование длины углеродной цепи жирных кислот обеспечивает механизм производства биотоплива с различными свойствами, поскольку жирные кислоты C10-14 используются в качестве компонентов реактивного биотоплива. А жирные кислоты C16-18 являются основными объектами производства биодизеля. Проведенные до настоящего времени исследования показали, что цианобактерии содержат большое количество жирных кислот C10-12 (*Trichodesmium*, выращенный в лабораторных условиях, составлял 50% от общего количества жирных кислот). Кроме того, жирная кислота C14 была обнаружена во многих штаммах цианобактерий - 14: 0 *Trichodesmium erythraeum* [54, 55] или *Phormidium* J-1 [56]; *Prochlorothrix hollandica* и 14: 1 в некоторых случаях содержит 30% жирных кислот цианобактерий [57]. Тем не менее, необходимо отметить что липидный состав у одних и тех же штаммов может отличаться при различных условиях культивирования, в ответ на различные экологические сигналы, что очень важно для их модуляции и позволяет надеяться на возможность параметрического управления составом жирных кислот.

В целом, по жирнокислотному профилю все цианобактерии условно объеденены в четыре группы. 1 группа включает виды цианобактерий, в частности представители мезофильных и термофильных видов *Synechococcus,* характеризующиеся только одной двойной связью в позиции Δ9 жирных кислот в области SN-l (C16 или C18 [57]; у цианобактерий 2 группы жирная

кислота C18 насыщена в позициях Δ9, Δ12 и Δ15, а кислота C16 содержит насыщенные жирные кислоты в позициях Δ9 и Δ12, характерно для *Anabaena, Nostoc, Gloeobacter vioaceus* и т. д. [58] жирная кислота C18 у цианобактерий 3 группы содержит насыщенные жирные кислоты в позициях Δ6, Δ9 и Δ12, это характерно для видов *Spirulina* и *Arthrospira*; 4 группа цианобактерий отличается насыщением позиций Δ6, Δ9, Δ12 и Δ15 жирной кислоты C18 (модельный штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803). Пальмитиновая кислота C16 не насыщается в 3 и 4 группах и позволяет в процессе секвенирования выявлять целые геномы штаммов цианобактерии [57]. Кроме того, гены основных десатураз жирных кислот непосредственно контролируют качество жирных кислот, исследование этих генов открывает возможности для классификации и дифференциации цианобактерий на основе жирных кислот. Как уже было исследовано, у большинства цианобактерий жирные кислоты C18 и C16 насыщаются в позициях Δ9 и -12. Это в основном представители видов *Synechococcus* и *Prochlorococcus* [59], и все они приспособлены к выработке диеновых жирных кислот [57].

Teminaa и другие (2006) исследовала содержание насыщенных и ненасыщенных жирных кислот *Nostoc* и других видов, выращивая их в различных сточных водах и регистрируя выделение липидов. Было показно, что встречаемость жирных кислот в семействе *Nostoc* различна. Был проведен статистический анализ изменчивости жирных кислот семейства *Nostoc* [60]. Tabatabai1 и другие (2018) провел процесс прямой трансэтерификации штамма *Fremyella diplosiphon* и идентифицировал метиловые эфиры жирных кислот (FAME). Алканы, которые являются основным компонентом обычного топлива, содержались в транс неэстерифицированных липидах штамма *Fremyella diplosiphon*, что подтвердило, что естественный синтез этих углеводородов не ингибируется при производстве биодизеля [61].

Sarsekeyeva и другие (2014), сделали филогенетический анализ штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 выделенной из соленого озера Балхаш и изучили его морфологические и ультраструктурные характеристики. Штамм характеризовался не зависящей от температуры системой Δ9-десатурации и

относительным количеством миристиновой (14: 0-30%) и миристолиевой (14: 1δ9-10%) кислот. Так же сообщают, что общее содержание C14 жирных кислот достигает 40%. Сообщается, что остальные жирные кислоты в основном состоят из пальмитиновой (16: 0) и пальмитолеиновой (16: 1δ9) кислот (сумма достигает около 60%). Такое содержание жирных кислот в сочетании с относительно высокой скоростью роста делает этот штамм достаточно потенциальным продуцентом для производства биодизеля [57]. Между тем, Sheng (2011) вместе со своей командой изучил липидный состав штамма дикого вида *Synechocystis* PCC 6803. По результатам исследовательской работы профиль жирных кислот выглядит следующим образом – C16:0 (~60%), C16:1 (~9.5%), C18:0 (~1.2%), C18:1 (~2%), C18:2 (~9.8%), и C18:3 (~16.5%).

Поскольку большинство исследований, проведенных в 21-м веке, были связаны с генной инженерией, в литературе имеется не мало сведений об улучшении продуктивности фототрофных микроорганизмов генетическими манипуляциями. Также, Eungrasamee и другие (2010) удалось найти гены жирных кислот штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803 и увеличить количество липидов, модифицировав их [32]. Rosgaard и другие разработали биосинтетические гены или регуляторные гены местных алканов цианобактерий и с помощью инженерных методов получили штаммы производящие активно липиды [62]. Одна из таких стратегий представлена в работе Ruffing и Jones (2012), где они увеличили производство и высвобождение свободных жирных кислот у цианобактерий *S.elongatus* PCC 7942 путем нокаута гена ацил-ASP-синтетазы и экспрессии тиоэстеразы [63]. Позже Santos-Merino и другие (2018), также в своей работе с *S. elongatus* PCC 7942, изучала содержание жирных кислот и проводила исследования экспрессии генов, кодирующих ферменты, участвующие в реакциях, с помощью генной инженерии. Они получили мутант штамма *S. elongatus* PCC 7942 и внесли изменения в состав жирных кислот. Некоторые из этих модификаций были использованы для улучшения производства омега-3 жирных кислот. В этой работе авторы представили новые данные о пути синтеза жирных кислот и новые стратегии,

которые могут быть использованы для манипулирования цианобактериями с насыщенной жирной кислотой [64].

Приведена информация о том, что гетерологичные гены, кодирующие глицерол-3-фосфатдегидрогеназу (GPD) и диацилглицерол-ацилтрансферазу (DGAT), были сконструированы в *Synechocystis* sp. PCC 6803 для увеличения синтеза G3P (глицерол-3-фосфатдегидрогеназы). Полученный рекомбинантный штамм *Synechocystis* продуцировал высокие уровни липидов без значительного снижения роста клеток. По сравнению со штаммом дикого типа содержание липидов и продуктивность сконструированных цианобактерий увеличились на 31-36 %. Они обнаружили, что усиление синтеза G3P является важным фактором фотосинтетической продукции липидов и что введение гетерологичных генов GPD и DGAT является эффективной стратегией увеличения продукции липидов у *Synechocystis* sp. PCC 6803 [65].

В целом, методы генетического модифицирования, особенно актуальны для быстрорастущих продуктивных штаммов цианобактерий, но с низким содержанием липидов и направлены таким образом на увеличение их липидной продуктивности. Все эти возможности генной инженерии стимулируют исследование цианобактерий как потенциального источника биодизельного сырья [66-67].

Немаловажным фактором влияющим на накопление липидов клетками и его биохимический состав является зависимость от условий их культивирования, где дефицит питательных веществ играет ключевую роль. При этом, известно, что производительность биомассы часто может иметь обратную связь с общей производительностью липидов. Высокое содержание липидов обычно вырабатывается в условиях стресса, особенно при ограничении питательных веществ, что в свою очередь снижает рост клеток продуцента. Также, Yalcin и другие (2020) провели исследование биохимического состава липидов одноклеточного, нитчатого штамма цианобактерии *Dolichospermum affine,* где общее содержание липидов в исследуемом виде по сравнению с контролем было на 10,67 % выше. 10 различных профилей жирных кислот были определены в биомассах, выращенных на 6 различных модифицированных

питательных средах. Во всех шести различных исследуемых случаях было зарегистрировано, что основной насыщенной жирной кислотой штамма *D. affine* была пальмитиновая кислота (C16: 0), при этом выделение жирной кислоты было на 40,61% выше при удалении N и P из питательных сред. Выделение олеиновой кислоты (C18: 1) было выявлено во всех случаях, но самый высокий показатель был зафиксирован в контрольной группе до 33,72%. Результаты данного исследования показали, что в условиях голодания азотом и фосфором, влияя на ценные вторичные метаболиты положительно влияли и на накопление липидов штаммом *D.affine* [33].

Аналогичные данные были получены Cordeiro и другие (2017), которые исследовали липидную продуктивность 4 видов рода *Microcystis*. Ими установлено, что наибольшее накопление липидов было характерно для штамма *Microcystis protocystis* (41,5%) при культивировании на контрольной среде чем в условиях обогащения питательной среды азотом. При этом отмечено, что питательная среда с низким содержанием питательных веществ способствовала оптимальному росту клеток и стимуляции накопления липидов, что может положительно влиять на стоимость процесса культивирования за счет снижения потребления питательных веществ [40].

В работе Loura и другие представлены данные влияния дефицита азота на липидный и жирнокислотный состав нитчатых цианобактерий *Pseudanabaena* sp. M2 и *Oscillatoria splendida* L3. Ими отмечено двукратное увеличение сухого веса в условиях дефицита азота, что по-видимому связано с выработкой клеточных полифосфатов и гликогена в ответ на дефицит азота. Общее количество липидов у *Osc.splendida* в условиях дефицита азота увеличилось с 46 мг/г СБ до 50 мг/г СБ. А в случае *Pseudanabaena* sp количество общего липида было одинково с контролем и составило 40 мг/гр биомасса, но по жирнокислотному составу был отмечен высокий уровень содержания жирных кислот C 18:3 и C 18:1 [68].

Помимо макроэлементов, дефицит некоторых микроэлементов тоже может положительно влиять на накопление липидов в клетках цианобактерий. Так, по данным Rathore и другие (1993) *Anabaena doliolum,* выращенный в условиях

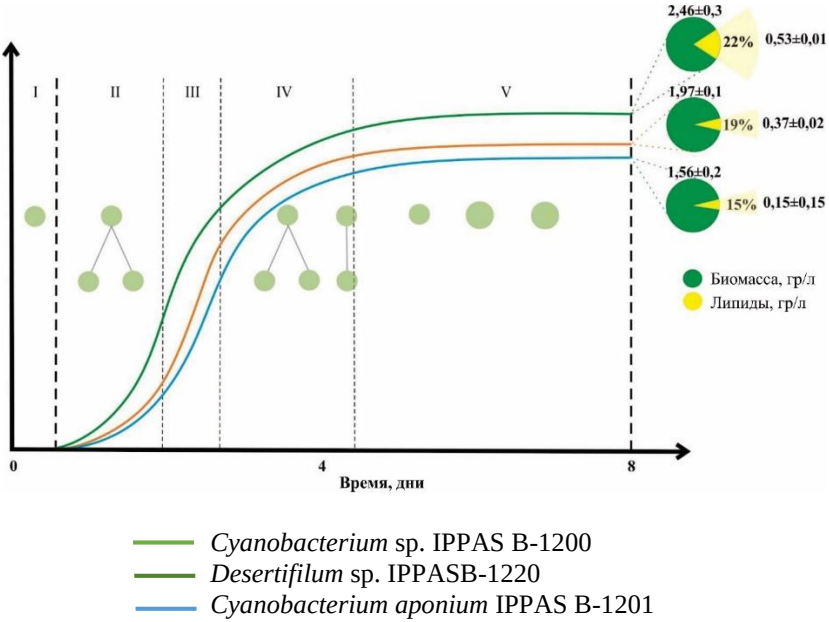
дефицита молибдена, производил меньше биомассы, но при этом отмечено увеличение общего липида в 1.5 раза (от 88 – до 122 мг/гр биомасса). Дефицит молибдена вызывал увеличение содержания в клетках дигалактозилдиацилглицерина и фосфатидилглицериновых липидов [69].

Таким образом, определяя потенциал цианобактерий в получении биодизеля, нужно отметить что они достаточно продуктивны, в короткие сроки производят биомассу, способны накапливать липидный продукт в 50-300 раз больше по сравнению с некоторыми другими источниками [70]. Однако несмотря на это, они до сих пор не используются коммерчески, поскольку получение и переработка биомассы цианобактерий в биодизель на сегодняшний день остается досточно дорогостоящим и нерентабельным процессом. Культивирование цианобактерий требует немалых расходов на макро- и микроэлементы, определенные затраты связаны с отделением биомассы от воды, экстракции и очистки липидов.

Затем мы изучили способность к производству биодизеля штаммов цианобактерий, отличных от микроводорослей. Известно, что оптимальный штамм цианобактерий, пригодный для производства биотоплива, должен обладать рядом необходимых характеристик, главными из которых являются не только высокий уровень накопления биомассы, но и продуктивность по липидам (до 20-40%) и состав продуцируемых жирных кислот, оптимальный для получения биодизеля [25].

В связи с этим, в следующей части данной работы проведено определение сухого веса, общего содержания липидов и анализ жирнокислотного состава клеток коллекционных штаммов цианобактерий, культивируемых на коммунально-бытовых сточных водах. Исследуемые штаммы культивировали на сточной воде из накопителя Сорбулак разбавленной питательной средой в соотношение 50:50, установленной на основании ранее проделанных работ как наиболее оптимальная среда. Инкубация производилась в течение 8 суток с начальной плотностью у всех исследуемых культур $ОП_{720}$ – 0,03. По истечению инкубационного времени биомассу отбирали для экстракции липидов.

Поскольку, в связи с различной продуктивностью цианобактерий, выход сухой биомассы у исследуемых штаммов был различным, было рассчитано процентное содержание липидов в 1 г сухого веса. Общее содержание липидов и выход сухой биомассы приведено на рисунке 2.




I - Лаг, II - Акц, III - Экс, IV - Дец, V – Стац, II-IV - Лог

Рис.2. Выход сухой биомассы и общее содержание липидов

Установлено, что содержание липидов в биомассе цианобактерий колеблется в пределах 15-22 % от сухого веса биомассы. Так, наибольшее содержание липидов наблюдается у штамма *Cyanobacterium* sp. IPPASB-1200 - 22 % от сухого веса. Неплохой показатель накопления липидов (19%) в биомассе выявлен и у штамма *Desertifilum* sp. IPPASB-1220. Штамм *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201 накапливает липиды значительно меньше, данный показатель для него равен 15 %.

В целом у различных видов фототрофных микроорганизмов отмечается большая гетерогенность как в качественном составе так и в количественных характеристиках. К настоящему времени накоплен существенный объем данных относительно содержания липидов у фототрофных микроорганизмов в расчете на сухую массу клеток. Выявлено, что содержание масла в наиболее перспективных из них составляет в среднем от 20-50% в расчете на сухое вещество. Так, суммарное содержание липидов у цианобактерии рода *Spirulina* составляет 6−16,6% сухого вещества. Для штаммов цианобактерий *Anabaena cylindrica, Anacystis nidulans, Nostoc canina* и *Nostoc muscorum* отмечено накопление липидов в пределах 10-13% [27]. Значительно высокое накопление липидов до 41,5% показано для штамма *Microcystis protocystis* [35]. Для *Synechococcus* sp. HS01 отмечено высокое накопление липидов до 56,5 мг л/сут [32].

Как известно, важным параметром, определяющим качество биодизельного топлива, является состав эфиров жирных кислот, структура которых влияет на ключевые свойства биодизеля, а именно на его цетановое число, температуру воспламенения, вязкость, окислительную стабильность, текучесть при низких температурах и т.д. В связи с этим к жирнокислотному составу липидов потенциальных продуцентов биодизеля предъявляется ряд требований, такие как высокое содержание насыщенных жирных кислот и малое количество полиненсыщенных. Это связано с тем фактом, что полиненасыщенные жирные кислоты являются восприимчивыми к полимеризации и образованию смол, вызванных окислением во время хранения. В то время как, высокое содержание эфиров насыщенных ЖК приводит к увеличению цетанового числа, а достаточное количество эфиров мононенасыщенных жирных кислот, например, эфира олеиновой кислоты, значительно улучшают свойства текучести биодизельного топлива при пониженных температурах [71].

В ходе работы были получены хроматографические профили (Рис. 3 а, б, в) и рассчитано содержание индивидуальных ЖК в цианобактериях *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201.

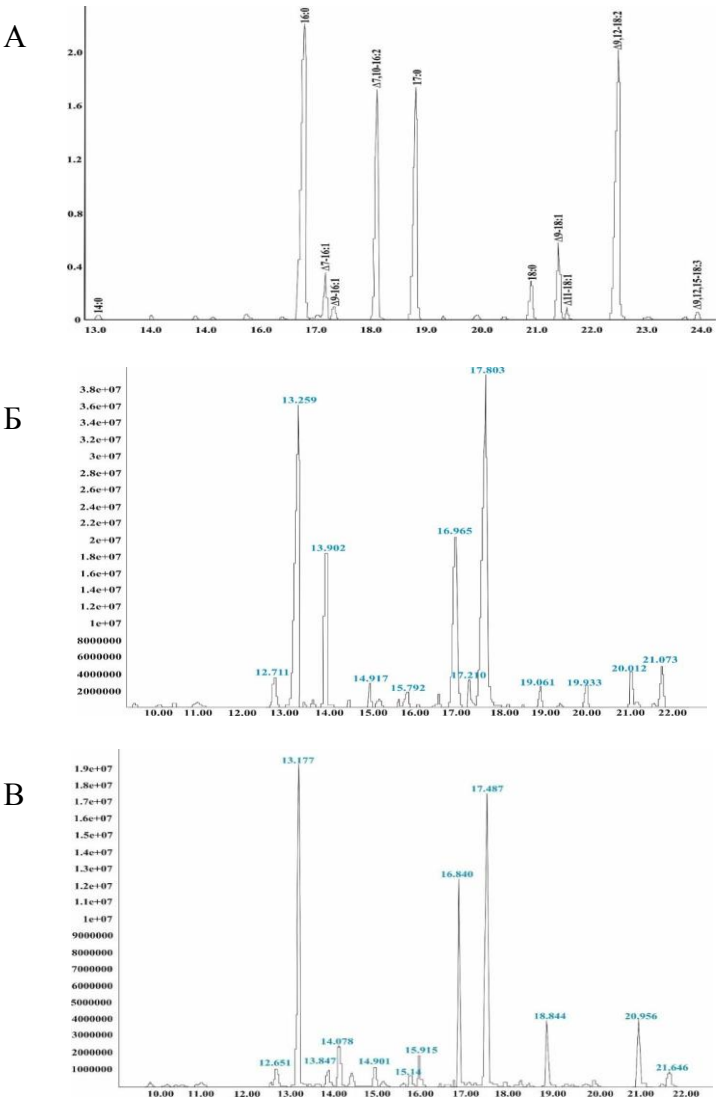



Рис. 3. Хроматограмма жирных кислот штаммов цианобактерий:
А-*Desertifilum* sp. IPPAS B-1220
Б-*Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200,
В - *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201.

Таблица 2. ЖК состав липидов цианобактерий

| Жирные кислоты | Массовая доля жирных кислот, % | | |
|---|---|---|---|
| | *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 | *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201 | *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 |
| 12:0 | 0,1 | 0,1 | - |
| 14:0 | 30 | 30,8 | 0,4 |
| 14:1Δ9 | 8,6 | 3,1 | - |
| 15:0 | 1,5 | - | - |
| 16:0 | 16,5 | 13,1 | 23,0 |
| 16:1Δ7 | 0,3 | 0,4 | 3,5 |
| 16:1Δ9 | 37,3 | 41,5 | 0,7 |
| 16:1Δ11 | 0,3 | - | - |
| 16:2Δ7,10 | - | - | 40,0 |
| 17:1Δ10 | 0,1 | - | |
| 18:0 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| 18:1Δ9 | 0,1 | 3,4 | 3,3 |
| 18:1Δ11 | 0,9 | - | 0,5 |
| 18:2Δ9,12 | 0 | - | 26,0 |
| Сумма насыщенных жирных кислот, % | 48,0 | 45,4 | 25,9 |
| Содержание жирных кислот, мг/г сухого веса | 59,6 | 52,2 | 51,9 |

Результаты определения массовой доли жирных кислот в клетках штаммов исследованных цианобактерий представлены в таблице 2. Анализ суммарных липидов показал присутствие 14 основных ЖК, с длиной углеродной цепи от 14 до 18 атомов. Определено, что в липидах штаммов рода *Cyanobacterium* присутствуют только насыщенные и мононенасыщенные ЖК. В то время как в клетках штамма *Desertifilum sp*. IPPAS B-1220 помимо этих кислот синтезировались также диеновые ЖК. Из насыщенных жирных кислот у исследуемых видов обнаружены

миристиновая, пальмитиновая и стеариновая кислоты. Ненасыщенные моноеновые кислоты представлены миристоолеиновой, пальмитолеиновой, олеиновой, *цис*-вакценовой кислотами. Соотношение отдельных жирных кислот и их количество постоянная величина, зависит от родовых особенностей цианобактерий и может быть использовано в качестве филогенетического маркера. Так, количество миристиновой кислоты (С14:0) у штаммов рода *Cyanobacterium* (~ 30 %) значительно превосходит содержание миристата у *Desertifilum sp*. IPPAS B-1220 (0,4). В то время как содержание пальмитиновой кислоты (С16:0) у *Desertifilum sp*. IPPAS B-1220 сравнительно больше (23,0%) чем у *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 (16,5%) и *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201 (13,1%). Кроме этого, у изученных видов идентифицированы моноеновые диеновые жирные кислоты, большая доля которых от общего числа жирных кислот приходилась на ненасыщенные кислоты С16 ряда. Из моноеновых жирных кислот преобладала пальмитолеиновая (С16:1Δ9), на нее приходилось 39,3% у *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и 41,5% у *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201. Для культуры *Desertifilum sp*. IPPAS B-1220 отмечено высокое содержание жирных кислот С16:2Δ7,10 – 40,0% и С18:2Δ9,12 – 26,0%. Согласно полученным результатам массовая доля насыщенных жирных кислот в липидном составе штаммов *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201 составляет 48% и 45,4 % соответственно, что значительно превосходит этот показатель у *Desertifilum sp*. IPPAS B-1220.

В результате проведенных исследований установлено, что из исследованных трех культур штаммы рода *Cyanobacterium* характеризовались приблизительно одинаковым составом жирных кислот и значительно превосходили штамм *Desertifilum* sp. IPPASB-1220 по содержанию насыщенных и мононенасыщенных ЖК со средней длиной цепи от С14 до С18, представляющих большой интерес для производства биодизеля. Известно, что биотопливо, содержащее соединения с большим количеством насыщенных связей, является более стойким к окислению, а при его сгорании не происходит полимеризация глицерина, что повышает надежность двигателей. Несмотря на

незначительную разницу в жирнокислотном составе, в качестве перспективного кандидата для получения биотоплива для дальнейших опытов был отобран штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 поскольку он характеризовался более высокой скоростью роста в условиях сточной воды и высокой концентрации $CO_2$, соответственно активным накоплением биомассы и липидов. Однако необходимо отметить и перспективность *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201, жирнокислотный состав которого тоже позволяет рассматривать их как исходное сырье для получения биотоплива**.** Допускается рассмотрение возможности получения биодизеля при культивировании этих штаммов как в монокультуре, так и в смешанной культуре.

На следующем этапе проводили массовое культивирование штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 в лабораторных условиях и регистрировали объем полученной биомассы и метиловых эфиров жирных кислот. При этом дальнейшее масштабирование ферментационного процесса проводили полунепрерывным (квазинепрерывным) способом культивирования в фотобиореакторе большего объема (100 л). Главной задачей данного масштабирования было не только сохранение высокого выхода биомассы, и соответсвенно целевых метаболитов, но и ее увеличение за счет продолжительности культивирования цианобактерии с сокращением времени адаптационного периода, что экономически целесообразно при производстве биодизеля.

Так культивирование клеток штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 проводили в оптимальных условиях, определенных в предыдущих экспериментах: на питательной среде разбавленной сточной водой в соотношении 50:50 при концентрации $CO_2$ – 10%, температура – 25$^{o}$C и освещении - 300 мкмоль/м$^2$/сек в течении 28 суток. При этом после получения накопительной биомассы с целью снижения эффекта ингибирования клеток продуктами метаболизма и недостатком субстрата производили отбор 2/3 части культуральной жидкости и подпитку суспензии таким же объемом свежей среды (50/50) через каждые 4 суток. Время экспозиции для получения накопительной биомассы составило 8 дней, оптическая

плотность ($ОП_{720}$) при этом увеличилась с 0,3 до 1,53±0,08. Затем при отборе и разбавлении культуральной жидкости оптическая плотность снижалась до 0,52±0,05 с последующим наращиванием биомассы в последующие 92 часа вновь до оптической плотности 1,52±0,05. Процедуру разбавления в течение всего эксперимента проводили 5 раз. Как видно из полученных результатов, динамика роста культуры после разбавления повторяла прежнюю динамику и характеризовалась колебанием концентрации микроорганизмов около одной и той же постоянной величины с постоянством средней удельной скорости популяции (рисунок 4). В результате наблюдался непрерывный рост культуры в фотобиореакторе, с продлением экспоненциальной фазы и фазы линейного роста клеточного цикла, без перехода в стационарную фазу роста. Биомассу клеток удаляли в логарифмической фазе и подвергали сушке. Известно, что вмешательство в процесс роста в любой фазе развития периодической культуры разбавлением питательной средой позволяет управлять процессами роста цианобактерий и таким образом регулировать выход и получение необходимого объема биомассы.

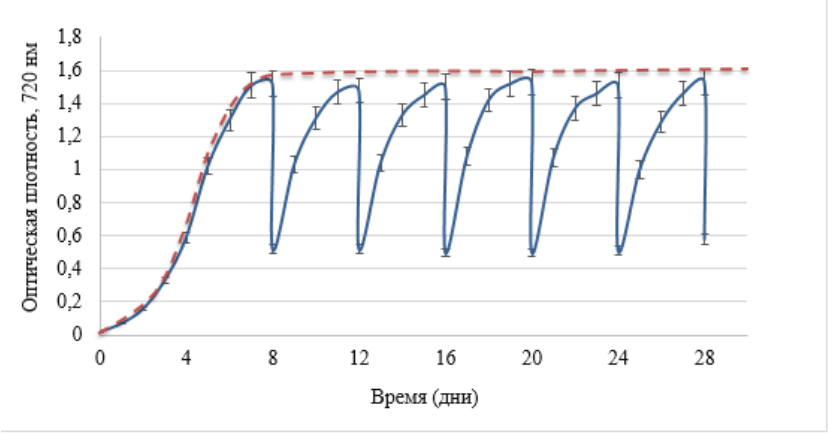



Рис. 4. Динамика роста штамма *Cyanobacterium* sp. при полунепрерывном культивировании (50% сточная вода+50% BG-11, 15% $CO_2$) в условиях лабораторного фотобиореактора

Таким образом за экспериментальный период (28 дней) выход сухой биомассы составил 1074,85±0,087 г на 100 л объема суспензии.

Далее для получения метиловых экстрактов жирных кислот из полученной биомассы экстрагировали липиды согласно вышеприведенной методике используя смесь растворителей гексан-изопропанол. При этом после отделения водорастворимых фосфолипидов, обрабатывали концентрированной фосфорной кислотой. Полученный остаток промывали трижды, просушивали и использовали в качестве исходного сырья для синтеза биодизельного топлива. Содержание липидов в полученном экстракте составило 23,1%. Синтез метиловых эфиров жирных кислот (биодизельного топлива) из выделенных липидов проводили реакцией переэтерификации в присутствии катализатора $H_2SO_4$.

Согласно полученным результатам, выход метиловых эфиров ЖК (биодизель) составил 94,7 % с объема 248,29±2,11 г биомассы штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, что в перерасчете составляет 0,21±0,013 г/л на 1 г сухой биомассы (Таблица 3).

Таблица 3. Содержание липидов и метиловых эфиров ЖК в биомассе штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200

| Штамм | Сухая биомасса (гр/ФБР*/ 28 дни) | Концентрация липида, (г/ФБР/28 дни) | Общее содержание липидов (% СБ) | Количество ЭЭЖК (гр/ФБР/ 28 дни) | Количество ЭЭЖК (% СБ) |
|---|---|---|---|---|---|
| *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 | 1074,85 ± ±5,62 | 248,29± ±2,11 | 23,1 | 235,13±3,11 | 94,7 |

*Размер ФБР 100 л

Сокращение: СБ – сухая биомасса

Таким образом, в результате массового культивирования полунепрерывным способом в лабораторных условиях штамма

*Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, характеризующегося высоким накоплением липидов и жирнокислотным составом, подходящим для получения биодизеля показана ее возможность в продукции метиловых эфиров ЖК. Общее содержание метиловых эфиров ЖК к суммарному содержанию липидов составило 94,7%.

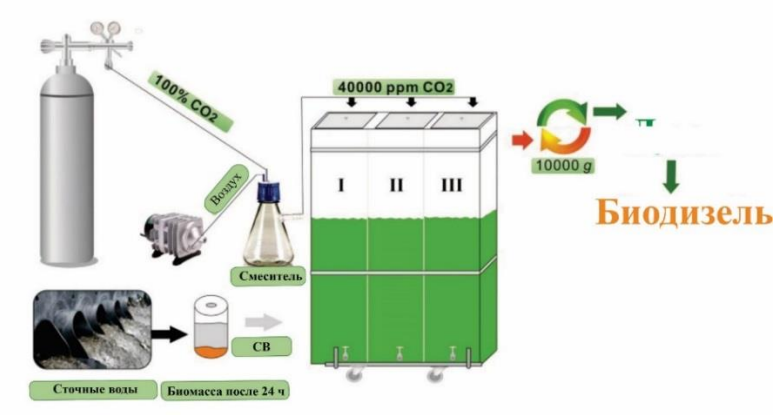



Рис. 5. Схема получения биодизеля путем культивирования штаммов цианобактерий на среде BG-11 и сточных водах с применением $CO_2$.

Важным этапом на пути к созданию экономически оправданной технологии получения биодизельного топлива из биомассы цианобактерий наряду с отбором высокоэффективных штаммов и изучением их метаболических возможностей является разработка эффективных и экономически выгодных подходов к процессу их культивирования (Рисунок 5). При этом применение безотходных и малоотходных технологии ресурсосберегающего производства позволяет значительно снизить нагрузку на окружающую среду. Так необходимо отметить о высоком потенциале использования сточных вод для культивирования продуцентов биодизеля в целях рентабельности и снижения себестоимости получаемой продукции. Описанные выше эксперименты проводились с целью снижения экономических затрат на получение сырья для

биодизеля на основе активных штаммов цианобактерий. Путем замены 50% питательной среды на сточные воды можно значительно снизить стоимость биодизеля, попутно проведя очистку данной загрязненной воды. Исследования влияния высоких концентраций $CO_2$ свидетельствуют о положительном его влиянии на рост культур цианобактерий, при этом установлено что они активно растут при обогащении среды 5-10% $CO_2$. Данный факт говорит о том, что заменив $CO_2$, полученный традиционным методом на отработанные газы $CO_2$ можно также снизить расходы и одновременно снизить эмиссию углекислого газа выделяемого различными производствами и ЭС в атмосферу, несомненно после ряда иследований о влиянии дымовых газов на рост фототрофов. Таким образом, проведенные исследования могут лечь в основу производственного получения биодизеля способствуя удешевлению себестоимости исходного сырья.

В результате проведенных исследований опрелены оптимальные условия для роста активного штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 – продуцента жирных кислот, обладающего высоким потенциалом для производства биодизеля. Полученные результаты указывают на перспективы, практическую значимость и необходимость дальнейшего изучения цианобактерий как биосистем, способных эффективно преобразовывать световую энергию в липиды и экологически чистое топливо.

Главными компонентами липидов сине-зелёных водорослей аналогично липидам других фитопланктонных организмов являются ненасыщенные жирные кислоты, преимущественно линолевая и линоленовая. Что касается других, менее распространенных, классов микрофитов, то биопродукция в них липидов отличается такой же выраженностью и направленностью. В качестве примера можно указать на эвгленовые водоросли, липиды которых содержат преобладающее количество ненасыщенных жирных кислот, характеризующихся цис-конфигурацией атомов водорода при двойных связях, что является основной предпосылкой для включения их в ряд ферментативных процессов, в частности,

процесс биосинтеза ПГ. Исследуя липидные фракции микрофита *Euglena gracilis,* Hulanicka и другие (1964) определили в них наличие следующих ненасыщенных жирных кислот: 7-гексадецено- 9-гексадеценовая, 7, 10-гексадекадиеновая, 4,7,10, 13-гексадека- тетраеновая, 11, 14-эйкозадиеновая, 8, 11,14-эйкозатриеновая, арахидоновая, 11,14,17-эйкозатриеновая, 8,11,14,17-эйкозатет- раеновая, 5, 8,11, 14,17-эйкозапентаеновая [20].

Скрининг выделенных новых культур микроводорослей проводили на основании результатов сравнительного анализа по продуктивности, который включал в себя культивирование в лабораторных условиях, определение сухого веса и анализ общего содержания липидов.

Биомассу микроводорослей наращивали в колбах при соответствующих для каждой культуры оптимальной температуре 22-28$^{o}$C и искусственном освещении 4000 лк. Биомассу для экстракции липидов отбирали в стационарную фазу роста культур через 14 суток культивирования. Количество сухой биомассы и липидов приведено в таблице 4.

Таблица 4 – Общее содержание липидов в биомассе выделенных штаммов микроводорослей

| Штаммы | Общее содержание липидов, г/л | Биомасса, г/л |
|---|---|---|
| *Chlorella vulgaris* sp -1 | 0,54±0,02 | 1,59±0,2 |
| *Chlorella pyrenoidosa* sp – 13 | 0,19±0,02 | 2,3±0,1 |
| *Chlamydomonas* sp-22 | 0,40±0,01 | 2,3±0,2 |
| *Ankistrodesmus* sp-21 | 0,39±0,01 | 1,79±0,3 |
| *Scenedesmus obliquus* sp-21 | 0,48±0,01 | 1,81±0,2 |

Так как биомасса у исследуемых штаммов разная, нами рассчитано процентное содержание липидов в 1 г сухого веса. Сводные данные по содержанию липидов в клетках в %, предста влены на рисунке 6.

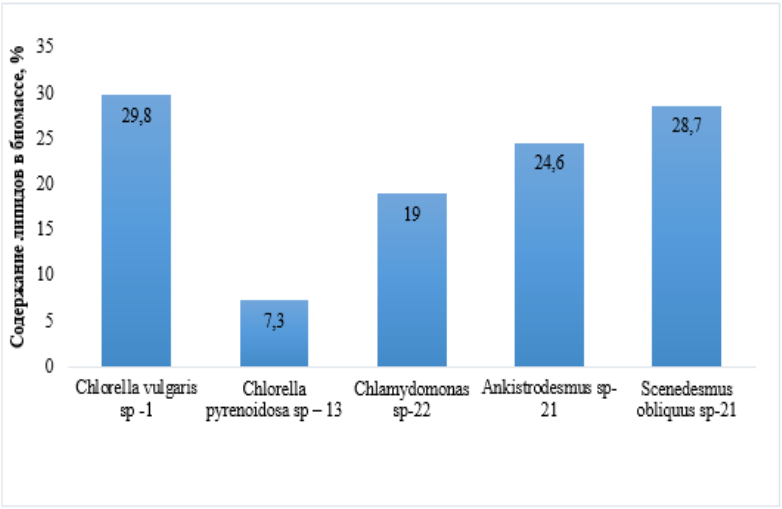



Рис. 6. Процентное содержание липидов в 1 г биомассы выделенных штаммов микроводорослей

Содержание липидов выделенных штаммов микроводорослей колеблется от 7,3 % до 29,8 % от сухого веса клетки. Наибольшее содержание наблюдается у штаммов *Chlorella vulgaris* sp-1 и *Scenedesmus obliquus* sp-21, что состовляет 29,8 и 28,7 % от сухого веса клетки соответственно. Неплохой показатель накопления липидов в биомассе и у штамма *Ankistrodesmus* sp-21 – 24,6%.

На следующем этапе работы проведен анализ жирнокислотного состава клеток выделенных штаммов.

Анализ жирнокислотного состава липидной фракции выделенных микроводорослей проводили методом газовой хроматомасс-спектрометрии. В результате исследований были получены хроматограммы жирных кислот (рисунки 7–11).

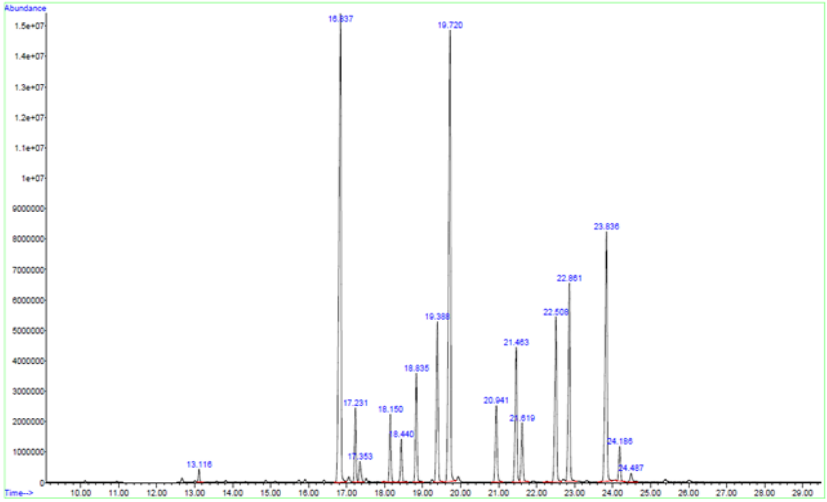



Рис. 7. Хроматограмма жирных кислот штамма микроводоросли *Chlorella vulgaris* sp-1, с использованием GCMS

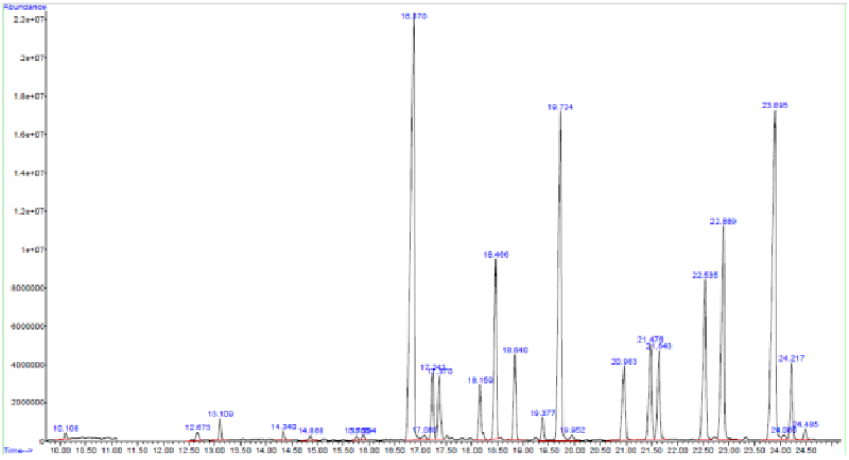



Рис. 8. Хроматограмма жирных кислот штамма микроводоросли *Ankistrodesmus* sp-21, с использованием GCMS

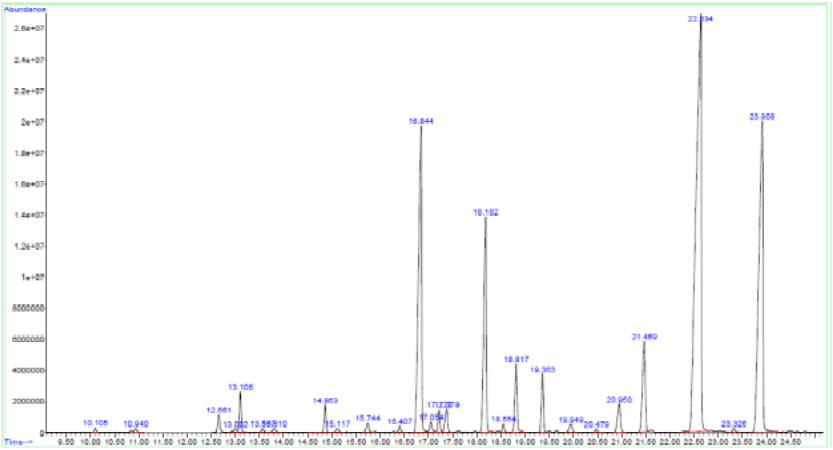


Рис.9. Хроматограмма жирных кислот штамма микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa* sp-13 с использованием GCMS

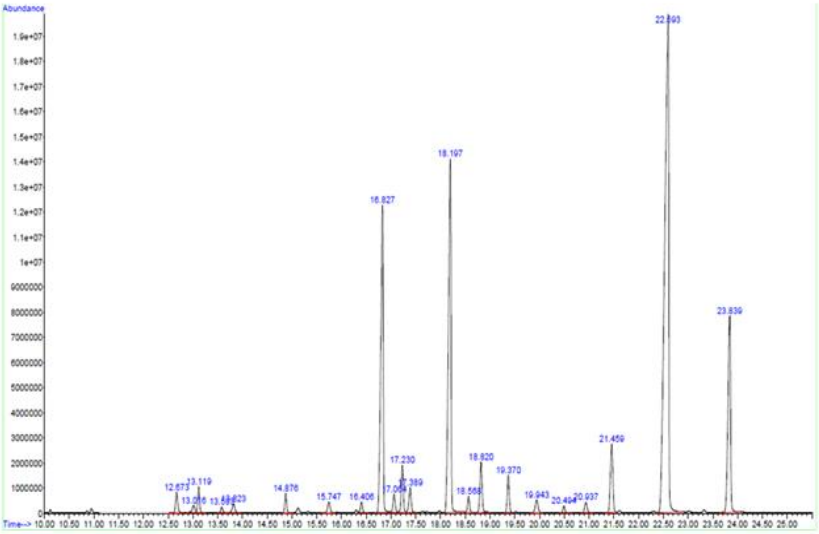


Рис.10. Хроматограмма жирных кислот штамма микроводоросли *Chlamydomonas* sp-22, с использованием GCMS

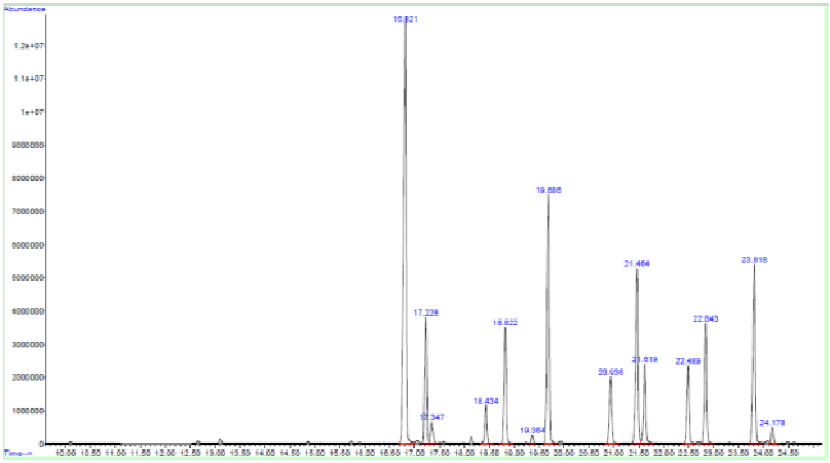


Рис.11. Хроматограмма жирных кислот штамма микроводоросли *Scenedesmus obliquus* sp-21, с использованием GCMS

Результаты определения массовой доли жирных кислот, в процентном соотношении представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Жирнокислотный состав выделенных микроводорослей с использованием GCMS

| Жирные кислоты | Массовая доля жирных кислот, % | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *Chlorella ulgaris* sp -1 | *nkistr.* sp-21 | *Scened. obliquus* sp-21 | *Chlorella yrenoidosa* sp-13 | *Chlamyd.* sp-22 |
| Лауриновая (12:0) | 0,1 | 0,5 | 0,2 | 0,3 | 0,2 |
| Миристиновая (14:0) | 0,6 | 0,9 | 0,4 | 1,8 | 1,3 |
| Пальмитиновая (16:0) | 26,9 | 27,1 | 33,9 | 19,3 | 17,8 |
| Стеариновая (18:0) | 3 | 2,7 | 3,6 | 1,4 | 0,5 |
| Арахиновая (20:0) | 0,1 | | | | |
| Пальмитолеиновая (16:1Δ7) | 3 | 2,5 | 7,7 | 0,9 | 2,2 |
| Пальмитолеиновая (16:1Δ9) | 1 | 2,6 | 1,6 | 1,2 | 1,4 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Гексадекадиеновая кислота 16:2Δ7,10 | 2,8 | 2 | 0,4 | 10,9 | 21,4 |
| Гексадекадиеновая кислота 16:2Δ9,12 | | | | 0,3 | 0,8 |
| Гексадекатриеновая кислота 16:3Δ7,10,13 | 6,9 | 0,8 | | | |
| Гексадекатриеновая кислота 16:3Δ4,7,10 | | 6,3 | 2,1 | 2,1 | 1,6 |
| Тетраеновой кислоты 16:4Δ4,7,10,13 | 19,9 | 12,8 | 13,2 | 0,1 | |
| Олеиновая (18:1Δ9) | 5,6 | 3,7 | 10,4 | 4,4 | 3,3 |
| Вакценовая кислота (18:1Δ11) | 2,3 | 3,2 | 4,3 | 0,1 | 0,1 |
| Линолевая (18:2Δ9,12) | 7 | 6,7 | 4,3 | 36,7 | 39,7 |
| γ-линоленовая кислота (18:3Δ 6,9,12) | 8 | 8,4 | 6,6 | | |
| α-линоленовая кислота (18:3Δ9,12,15) | 11,4 | 17,2 | 10,6 | 20,6 | 9,8 |
| Стиоридовая кислота 18:4 Δ6,9,12,15 | 1,4 | 2,6 | 0,9 | | |
| Сумма насыщенных жирных кислот, % | 30,7 | 31,2 | 38,1 | 22,8 | 19.8 |
| Сумма полиненасыщенных жирных кислот, % | 69,3 | 68,8 | 62,0 | 77,2 | 80,2 |
| Содержание жирных кислот, мг/г сухого веса | 90,2 | 93,0 | 92,2 | 82,4 | 84,2 |

Полученные данные свидетельствуют о том, что в липидном экстракте исследованных микроводорослей присутствовали как насыщенные так и ненасыщенные жирные

кислоты (ЖК), наибольшую массовую долю из которых составляли С14:0, С16:0, С18:2 и С18:0. В результате хромато-масс-спектрометрии в клетках исследуемых штаммов были определены жирные кислоты, из них 5 важных кислот такие, как лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая (НЖК) и линолевая кислота (ПНЖК).

Установлено, что среди насыщенных жирных кислот преобладают пальмитиновая (26,9%, 27,1% и 33,9 %) у штаммов *Chlorella vulgaris* sp -1, *Ankistrodesmus* sp-21 и *Scenedesmus obliquus* sp-21 соответственно и стеариновая в колличестве 2,7% и 3,9% у штаммов *Ankistrodesmus* sp-21 и *Scenedesmus obliquus* sp-21 соответственно. Необходимо отметить также тот факт, что штаммы *Ankistrodesmus* sp-21, *Chlorella vulgaris* sp -1 и *Scenedesmus obliquus* sp-21 характеризуются достаточным количеством тетраеновой кислоты, содержание которых составило 19,9%, 12,8% и 13,2 % соответственно и линоленовой кислоты до 8%, 8,4% и 6,6 % соответственно. В то же время в клетках штаммов *Chlorella pyrenoidosa* sp – 13 и *Chlamydomonas* sp-22 основными жирными кислотами являются линолевая (36,7% и 39,7%) и гексадекадиеновая (10,9% и 21,4 %). Сравнительно большое линолевой кислоты (12%) обнаружено у штамма *Chlorella pyrenoidosa* sp – 13**.** Штаммы *Chlorella vulgaris* sp -1 и *Scenedesmus obliquus sp-21* также в высоком количестве содержат олеиновую жирную кислоту. Остальные жирные кислоты в клетках исследованных штаммов присутствуют в незначительном количестве. Высокая массовая доля насыщенных жирных кислот наблюдается в клетках штамма *Scenedesmus obliquus* sp-21 и составляет 47,1 %, а ненасыщенных жирных кислот у штамма *Chlamydomonas* sp-22 – 80,3 %.

Исследованием выделенных штаммов на накопление биомассы, общее содержание липидов и жирнокислотный состав установлено, что, несмотря на незначительную разницу в скорости роста и накоплении биомассы микроводоросли характеризуются различным накоплением жирных кислот. Поскольку для производства биодизеля важное практическое значение имеют штаммы микроводорослей характеризующиеся высоким содержанием насыщенных жирных кислот, для дальнейших

опытов как перспективный кандидат для получения биотоплива по этим параметрам был отобран штамм, выделенный из термальных источников *Scenedesmus obliquus* sp-21.

Поскольку важным этапом на пути к созданию экономически оправданных технологий получения биодизеля из биомассы микроводорослей является оптимизация условий выращивания микроводорослей, на следующем этапе проведены исследования по изучению влияния некоторых условий культивирования на рост выделенного штамма микроводоросли и накопление липидов. Наиболее часто применяемыми приемами для увеличения содержания липидов в клетках микроводорослей является лимитирование минеральной среды при культивировании по источнику различных веществ, в частности азота. В связи с этим, нами в следующем цикле опытов изучено накопление липидов клетками данного штамма в условиях азотного и фосфорного голодания. Фосфор, как и азот, является одним из важнейших элементов, необходимых для роста и развития живых организмов, недостаток которого в питательной среде, ведет к различным изменениям метаболизма.

Фосфорное и азотное голодание создавали изmtнением коцентрации солей в составе среды Тамия рассматриваемого элемента (соответственно, в виде $KNO_3$ и $K_2HPO_4$). Было изучено влияние среды Тамия с 10% содержанием $KNO_3$ и $K_2HPO_4$ и полностью лишенная этих солей на накопление липидов клетками микроводоросли. С целью контроля динамики роста штамма в условиях азотного и фосфорного голодания пробы отбирались через каждые 24 часа в течение 7 суток, биомассу для определения содержания липидов получали через 7 суток культивирования. Изучение роста микроводоросли на полной питательной среде и в условиях фосфорного и азотного голодания показало, что в условиях дефицита как азота так и фосфора интенсивность роста культуры в первые 3-4 дня культивирования снижалась приблизительно в 1.5 - 2 раза на обедненных средах и в 2-3 раза на средах лишенных источника данных элементов. Полученные результаты представлены на рисунке 12.

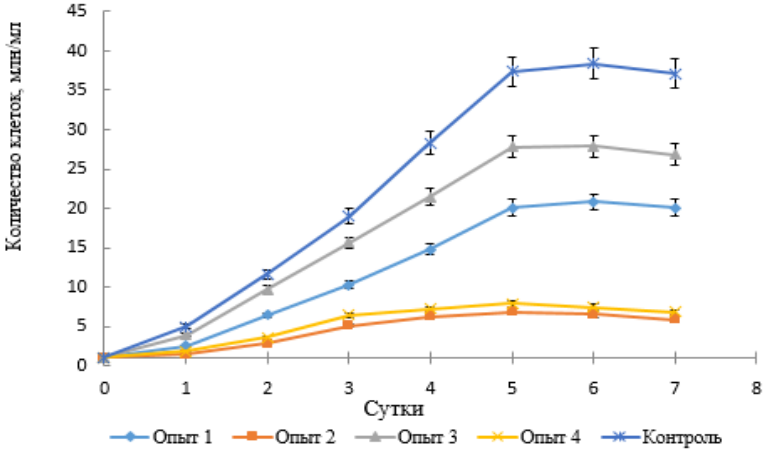



Рис. 12. Динамика роста клеток микроводоросли *Scenedesmus obliquus* sp-21 в условиях азотного и фосфорного голодания

Согласно полученным данным, как и следовало ожидать, интенсивность роста культуры в контрольном варианте на полной среде Тамия была высокой, в то время как во втором варианте опыта при значительном снижении канцентрации азота в среде наблюдается и снижение темпа роста культуры. Полное отсутствие источника азота в питательной среде сильно ингибирует размножение микроводоросли. Аналогичная картина наблюдается и в опытных вариантах в условиях фосфорного голодания. Однако в опытных вариантах с ограничением источника фосфора в сравнении с азотным голоданием рост микроводоросли был немного выше. Так, к 72 часам культивирования плотность культуры, выращенной на полной питательной среде достигла порядка $19x10^6$ кл/мл, в условиях недостатка азота (опыт 1) – $10,3x10^6$ кл/мл и в условиях недостатка фосфора (опыт 3) –$15,6x10^6$ кл/мл.

Таким образом, азотное и фосфорное голодание замедляет накопление биомассы в клетках *Scenedesmus obliquus* sp-21. При этом необходимо отметить изменение цвета культуры на 3 сутки культивирования в опытных вариантах 2 и 4, культура

приобретает жёлтую окраску, тогда как в контроле, за все время культивирования она остаётся зелёной, в опытных вариантах с незначительными концентрациями азота и фосфора светло зеленой в соответствии с плотностью клеток водорослей. Изменение окраски культуры свидетельствовало об изменении пигментного состава клеток. Вероятно, это связано с пагубным влиянием как азотного так и фосфорного голодания на фотосинтез. Как известно, ограничение доступности фосфатов может привести к снижению фотосинтетической активности и соответственно к снижению темпов роста [20]. Ингибирование белкового синтеза, вызванное азотным голоданием, также приводит к разрушению фотосинтетического аппарата и увеличивает вероятность фотоокислительных процессов, губительных для клетки.

Определение содержания липидов в биомассе проводили 7 суток культивирования. Результаты липидного анализа в контрольном и во всех опытных вариантах представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Общее содержание липидов в биомассе *Scenedesmus obliquus* sp-21 в условиях азотного и фосфорного голодания

| Вариант | Среда | Выход биомассы, г/л | Общее содержание липидов, г |
|---|---|---|---|
| Контроль | Тамия | 2,4 ±0,2 | 0,5±0,1 |
| Опыт 1 | Тамия 10% $KNO_3$ | 1,7 ±0,1 | 0,6±0,1 |
| Опыт 2 | Тамия – $KNO_3$ | 0,8±0,1 | 0,2±0,1 |
| Опыт 3 | Тамия 10% $K_2HPO_4$ | 1,9±0,1 | 0,5±0,2 |
| Опыт 4 | Тамия – $K_2HPO_4$ | 0,9±0,1 | 0,3±0,2 |

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что во всех испытанных опытных условиях культивирования, дифицит азота и фосфора направляет потоки углерода внутри клеток микроводоросли к накоплению липидов, в то время как среда полного состава Тамия приводит к высокой продукции биомассы, но с низким содержанием липидов.

Наибольшее содержание липидов индуцировалось в вариантах обедненных азотом и фосфором до 10%. Установлено, снижение концентрации азота и фосфора в питательной среде в 10 раз индуцирует активное накопление липидов в клетке. Содержание липидов при этом достигает до 0,3- 0,6 гр от сухого веса что составляет 33- 35%.

Анализируя результаты экспериментального исследования новых штаммов микроводорослей, выделенных из горячих источников, можно со всей определенностью сделать вывод о том, что жирнокислотный состав водорослей определяется в первую очередь их видовой принадлежностью. Так, в результате анализа их жирнокислотного состава определено 18 компонентов, 5 из которых составляют насыщенные жирные кислоты. Как известно, среди насыщенных жирных кислот пальмитиновая и стеариновая кислоты являются необходимыми кислотами при переэтерификации для получения биодизельного топлива. Известно, что вязкость жидкого биодизельного топлива увеличивается с длиной цепи ЖК и их окислительная устойчивость уменьшается с что оптимальными условиями высокого накопления липидов в биомассе клеток является увеличением ненасыщенности ЖК [20]. Так, биодизель полученный из насыщенных и мононенасыщенных ЖК с короткой углеродной цепью, является более высококачественным. Из всех исследованных штаммов в относительно высоком количестве эти насыщенные жирные кислоты содержатся в клетках культуры *Scenedesmus obliquus* sp-21, что позоляет рассматривать его в качестве потенциального кандидата с целью получения сырья для биодизеля. Изучение влияния азотного и фосфорного голодания на накопление липидов показало, что несмотря на замедление накопления биомассы культуры *Scenedesmus obliquus* sp-21 при дефиците этих элементов оптимальными условиями высокого накопления липидов в биомассе клеток является снижение концентрации азота или фосфора в питательной среде в 10 раз. Содержание липидов при этом достигает до 0,3- 0,6 г от сухого веса что составляет 33- 35%. Как известно, не смотря на то что, фосфор является обязательным компонентом для роста всех организмов, микроводоросли обладают способностью снижать

физиологическую потребность в фосфоре на целых 50% в ответ на ограничение фосфора и при этом синтезировать необходимые, ценные метаболиты [21].

### 1.2. Эффективность используемых подходов в получении липидов из биомассы фототрофных микроорганизмов

Однако необходимо отметить, что помимо разработки эффективных экономически выгодных подходов к культивированию цианобактерий, существует еще один немаловажный момент играющий существенную роль при коммерческой реализации данной технологии. Это методологическое обеспечение технологии отделения биомассы цианобактерий и выделения из нее липидов. В частности, одними из современных проблем широкого использования цианобактериальной биомассы для производства биотоплива являются разделение биомассы и оптимизация методологии выделения липидов из жидкости. Кроме того, клетки цианобактерий окружены клеточными стенками, препятствующими выделению внутреннего липида. В связи с этим исследования по разрушению оболочки клеток для улучшения экстракции липидов, выбор оптимальных растворителей все еще требует полноценных исследований. Зависимость выхода липидов от используемых методов пред подготовки биомассы и выделения липидов, предопределяет важность анализа используемых в настоящее время методов. Поэтому оптимизация и модификация существующих методов и постоянный поиск новых катализаторов переработки биомассы микроводорослей в биодизель, позволяют значительно удешевить этот процесс [25].

Методологическое обеспечение технологии промышленного производства биодизеля на основе цианобактерий включает все методы основных стадий данного процесса, начиная от концентрирования выращенной биомассы цианобактерий до методов экстракции липидов (Рисунок 13). При этом необходимо отметить большое разнообразие существующих методов, которым к настоящему времени посвящено немало обзорных и экспериментальных статей. В

данном разделе статьи мы не будем подробно останавливаться на описании всех известных методов получения липидов, а лишь проведем краткий сравнительный анализ некоторых из них, с определением преимуществ и недостатков и определением их влияния на суммарный выход липидов у фототрофных микроорганизмов.

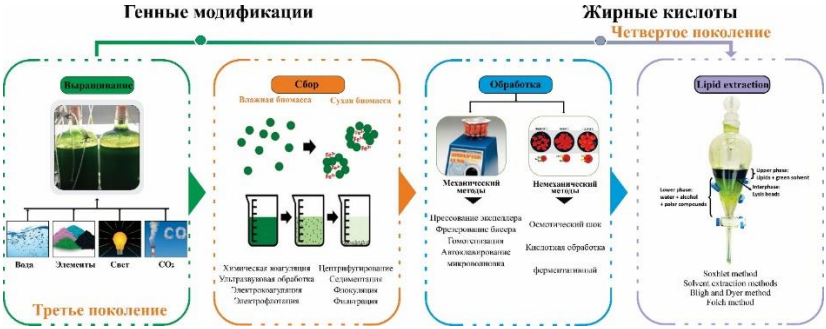



Рис. 13. Методологическое обеспечение технологии получения липидов на основе цианобактерий

*Методы дезинтеграции клеток фототрофных микроорганизмов и экстракции липидов.*

Анализируя методологию следующего этапа данной технологии, хочется отметить о не менее важности методов используемых при разрушении клеток цианобактерий. Как известно, сама процедура экстракции липидов включает разрушение клеток и собственно саму экстракцию липидов с помощью различных растворителей. К сожалению в литературе работ, посвященных изучению влияния методов разрушения клеток фототрофных микроорганизмов на общий выход липидов недостаточно, кроме того сложность сравнительного изучения связана с использованием экспериментаторами комбинаций различных методов разрушения клеток с различными методами экстракции, а также при этом еще и использованием растворителей различной природы. Но несмотря на все это, правильный выбор метода разрушения клеток несомненно предопределяет успешность конечного

результата [72]. При этом, необходимо отметить, что несмотря на более упрощенное строение клеточной стенки цианобактерий по сравнению с микроводорослями, она все же является барьером, препятствующим извлечению липидов из клеток и качество липидов, и соответственно общая липидная продуктивность штамма напрямую зависит от правильно подобранного метода дезинтеграции их клеток. Безусловно предпочтение отдается методам характеризующимся низкой энергоемкостью и высокой производительностью, исключающим разрушение либо изменения целевого продукта.

Механические методы разрушения клеточной оболочки, осуществляющиеся в основном с применением твердых (например, высокоскоростная гомогенизация) и жидких механических сил (гомогенизация под высоким давлением, микро-флюидизация), требуют передачи энергии клеткам, либо на основе волн (лазерная, ультразвуковая и микроволновая обработка), либо обычного тепла (автоклавная и водяная ванна) или использованием импульсного электрического поля [73].

Среди них одним из часто используемых методов разрушения клеток фототрофных микроорганизмов является **Прессование экспеллера**, не требующий дорогостоящей техники и предполагающий использование простых химических веществ. В основном, получение липидов с помощью экспеллера используется для нитчатых цианобактерий, и в настоящее время до 75% липидов, вырабатываемых фототрофными микроорганизмами, получают при разрушении клеток этим методом. При этом в зависимости от типа биомассы, могут использоваться различные конфигурации экспеллеров: винтовые, поршневые и т.д. Однако необходимо отметить, что этот метод относительно медленный и требует много цианобактериальной биомассы.

Одним из эффективных методов, наиболее часто используемых в работах по измельчению биомассы микроорганизмов является бисерное фрезерование. Этот метод имеет много преимуществ, таких как высокое разрушение клетки, легкая загрузка биомассы, оптимальная рабочая температура и применение для различных типов биомассы от лабораторного до промышленного масштаба. Успешное

разрушение клеток обеспечивается за счет правильного положения и скорости смесителя, оптимального вращения потока суспензии независимо от концентрации биомассы. Cheng и другие (2011) в своих исследованиях показал высокую липидную продуктивность метода Бисерное фрезерование модифицированного использованием смеси SC-$CO_2$ для клеток цианобактерии *Pavlova* sp. Клетки цианобактерии высушивали с помощью распылителя диаметром 3 мм, а процесс экстракции через стеклянные бусины проводили под высоким давлением. Метод **Бисерное фрезерование**, проведенный с использованием смеси SC-$CO_2$, показал высокий выход липидов (15,7%.) нежели использование N-гексана (10,4%) [74].

Метод импульсного электрического поля, при котором внешнее электрическое поле создает критический электрический потенциал через клеточную мембрану, увеличивает ее пористость и высвобождение липидов из клеток. Таким образом, обработка *Synechocystis* PCC 6803 импульсным электрическим полем и изопропанолом в качестве растворителя значительно увеличивала общий выход липидов.

В последнее время широко используемым методом разрушения микробных клеток микроводорослей и цианобактерий, бактерий и дрожжей является Гомогенизация под высоким давлением. Гомогенизация высокого давления это простая система разрушения микробной биомассы, при этом ее часто можно использовать для взрывания влажной биомассы, где обрабатывающая жидкость подвергается давлению в усилителях и проходит через камеру гомогенизации. Samarasinghe et. al. (2012) в своей исследовательской работе с микроводорослями *Nannochloris oculata* с помощью этого метода зафиксировали выход липидов до 60% [75]. Kim и другие (2010) в соих работах показали, что, использование высокого давления является наиболее простым и легким методом в разрушении клеток. Авторы использовали осмотическое давление для разрушения микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii*, *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmu*s sp. при изучении накопления липидов их клетками. [76].

Одним из наиболее часто применяемых для цианобактерий эффективных методов разрушения их клеток является метод Ultrasonication.

При обработке клеток ультразвуком создаются акустический поток и кавитация, воздействующие на клетки в виде микротрубочек, создавая давление, которое приводит к разрушению клеточных стенок и внутриклеточных мембран. Получению липидов в комбинации с ультразвуком посвящено много научных работ [5].

Wu и другие (2012) использовали низкочастотное (20 кГц) высокоинтенсивное (0,0403 Вт/см$^3$) ультразвуковое воздействие для разрушения клеток *Microcystis aeruginosa* и обнаружили, что ультразвуковая деградация воды генерирует свободные радикалы, которые ослабляют клеточную стенку цианобактерий [77]. Исследования Keris-Sen и другие (2014) показали, что нарушение структуры клетки с помощью ультразвука значительно повышает липидную продуктивность, при этом значительно сокращается время обработки клеток [78]. У Kaiwan-arporn и другие (2012) процедура экстракции липидов, включающая обработку ультразвуком и экстракцию хлороформом: метанолом привела выходу до 18,58% липидов у цианобактерии *Synechocystis aquatilis* TISTR8612. Несмотря на высокую эффективность данного метода, существуют методы, позволяющие еще больше повысить суммарный выход липидов [79]. Так Qv et al (2014) установлено, что при экстракции липидов микроводоросли *Dunaliella tertiolecta* с привлечением ультразвука и микроволновых лучей, скорость экстракции при обработке ультразвуком была ниже и составила 45,94% при времени экстракции 5 мин, чем при воздействии **микроволнового облучения**, где данный показатель был равен 57% с сокращением времени воздействия до 160 сек. Полученные ими результаты свидетельствует о значительно большей эффективности микроволновых лучей нежели ультразвука. Метод **Микроволновое облучение** это достаточно широко используемый метод извлечения липидов из микроорганизмов воздействием электромагнитных волн на суспензии клеток в органическом растворителе [80]. Приводятся также данные сравнения экстракции липидов у *Nannochloropsis*

sp с использованием метода разрушения клеток микроволновым облучением и нагреванием в водяной бане, полученные результаты были также в пользу Микроволновое облучение – 38,31% против 23,01% [81].

Безусловно комбинация нескольких методов одновременно с целью оптимизирования условий их проведения (снижение времени обработки, мощности и соответственно энергоемкости, увеличению скорости экстракции) может быть успешно использована и способствовать увеличению общей липидной продуктивности [80].

Наряду с механическими методами дезинтеграции клеток, имеющих ряд недостатков, таких как, недостаточная производительность экстракции, использование вредных растворителей и продолжительность процедуры, большими перспективами обладают немеханические методы разрушения, такие как химический и ферментативный клеточный лизис. Если применение химических реагентов (щелочей, кислот, солей) предполагает их воздействие на клеточную оболочку, вызывая денатурацию и коагуляцию белков, окисление компонентов клеточной стенки, сопровождаемое воздействием реагентов и на другие клеточные структуры, то использование различных ферментов - ксиланазы, целлюлазы, амилазы, папаина, пектиназы и гемицеллюлазы обеспечивает разрушение связей между веществами клеточной стенки без разрушения целевого продукта. Han и другие (2018) используя этот метод для штамма *Scenedesmus* sp., получили выход 96.4% липида [31]. Maffei и другие (2018) при работе с морской микроводорослю *Nannochloropsis* sp., обрабатывая штамм с целлюлазой и маннаназой, улучшили выход липидной экстракции с 40,8% до 73% [82].

Приводятся данные использования для лизиса стенок клеток микроводорослей гидрофильной ионной жидкости, 1-бутил-3-метилимидазолия при выделении клеточных липидов. Гидрофильная ионная жидкость разрушает клеточные стенки и образует две несмешивающиеся фазы, одна из которых состоит из липидов. После смешивания гидрофильной ионной жидкости с суспензией клеток микроводорослей, гидрофобная фаза

липидов, из-за действия силы тяжести оказывается сверху, где она удаляется из смеси и очищается.

Несмотря на разнообразие существующих методов дезинтеграции клеток, следует отметить, что цианобактерии, в отличие от микроводорослей, легко подвергаются генетическим манипуляциям, что в свою очередь позволяет проводить с ними генно-инженерные работы с целью упрощения некоторых этапов этой технологии. Генетически модифицированные штаммы, представляющие большой интерес для исследователей как ресурс для получения топлива четвертого поколения, позволяют избежать дорогостоящих стадий сбора биомассы и распада клеток. Способность таких генно-инженерных штаммов цианобактерий выделять в питательную среду конечные продукты метаболизма, в том числе свободные жирные кислоты, несомненно, значительно упрощает технологию переработки биомассы при производстве биодизеля. Так, сообщается, что удаление гена *sll*1951 поверхностного белка в генетически модифицированном штамме *Synechocystis* значительно ослабляет пептидогликановый слой клеточной стенки и, таким образом, способствует увеличению секреции СЖК в культуральную среду. Приведены сведения, что такие свободные жирные кислоты откладываются в виде кольца на стенках колб и накапливаются в питательной среде над водной фазой. Безусловно, такая способность штаммов цианобактерий выделять в питательную среду гидрофобные жирные кислоты значительно упрощает процесс их выделения и, главное, исключает этапы периодического накопления биомассы и разрушения клеток.

Таким образом, поскольку стадия обезвоживания биомассы с последующей сушкой является достаточно энергоемким процессом, в связи с чем энерговклад при производстве липидов превышает энерговыход из полученного липида, разработка методов экстрагирования липидов без этих вспомогательных операции сегодня очень актуальны. Помимо воздействия на клетки генно-инженерными методами, избежать стадии обезвоживания, высыхания и распада клеток можно с помощью специальных растворителей. Так, приводятся сведения об использовании диметилового эфира (ДМЭ), обладающего

высоким сродством как к воде, так и к органическим соединениям и способного проникать через клеточные стенки. С помощью ДМЭ удалось извлечь 26,4% от общего количества сырых липидов и 54,4% от общего количества метиловых эфиров жирных кислот [43]. Безусловно, такие подходы более экономичны, так как позволяют проводить дегидратацию одновременно с экстракцией липидов и не требуют разрушения клеток.

В общем, этап экстракции липидов является ключевым этапом процесса и представляет собой важное узкое место для производства биодизеля в промышленных масштабах.

Несмотря на успехи в культивировании цианобактерий, получении их активных штаммов, представляющих большой интерес в области биоэнергетики, до сих пор отсутствуют коммерчески успешные промышленные способы извлечения липидов из их биомассы. Существующая в настоящее время совокупность методов экстракции липидов из биомассы фототрофных микроорганизмов представлена разновидностями таких основных методов, как: метод Сокслета, Превосходные методы экстракции растворителем, метод Блая и Дайера и метод Фолча, которые отличаются использованием различных растворителей или сочетание разнообразных растворителей и их различных соотношений. Традиционные методы экстракции имеют ряд ограничений для крупномасштабного производства биодизеля, таких как токсичность растворителя, используемого при экстракции, специфичность используемых растворителей, загрязнение окружающей среды отработанными растворителями и высокая энергоемкость растворителя. -процесс разделения липидов, предполагающий большие затраты на их последующую очистку и перегонку [83]. Основной проблемой при экстракции липидов из биомассы является наличие остаточной воды, препятствующей полному разделению фаз и снижающей эффективность процесса. В связи с этим большое значение имеют технологии, обеспечивающие извлечение липидов и не требующие предварительной сушки биомассы. Для устранения этих недостатков исследователи, использующие множество модификаций, постоянно ищут усовершенствованные методы. Известны методы гидролиза

липидов in situ и сверхкритической переэтерификации *in situ* (SC-ST/E) для экстракции липидов из влажной биомассы водорослей Khan и другие (2018). В этом методе влажная биомасса водорослей перерабатывается для извлечения липидов с последующей переэтерификацией для получения биодизельного топлива [14].

Таким образом, подводя итоги, следует отметить, что существует множество способов уничтожения микробных клеток и выделения из них липидов. Каждый метод эффективен и специфичен, поэтому процессы модификации все еще продолжаются. Однако, согласно обзору, наиболее часто используемыми и более продуктивными методами разрушения клеточной структуры являются микроволновое облучение и ультразвуковая обработка. Методом микроволнового облучения из вида *Trichosporon* sp. при производстве количество липидов составило 43,1% [5], тогда как методом микроволнового облучения было получено 57,1% липидов [80].

Что касается методов собственно экстракции липидов, то существующие методы основаны на методе Фолча, в котором используются органические растворители, применение которых вызывает разделение и осаждение липидов в верхней фазе раствора. Метод Блая и Дайера, гравиметрический метод, характеризуемый соотношением органических растворителей, до сих пор широко используется для оценки липидов технологами водорослей и используется как для экспериментальных, так и для крупномасштабных процессов экстракции. Существует довольно много модификаций этого метода, направленных на повышение продуктивности и снижение его токсичности. Наиболее распространенной модификацией является добавление 1M NaCl вместо воды, 0,2 M фосфорной кислоты, HCl, уксусной кислоты и метил-трет-бутилового эфира (МТБЭ) [84] Однако все перечисленные модификации метода предполагают использование хлороформа, который, несмотря на то, что обеспечивает эффективную экстракцию, все же не пригоден для крупномасштабного применения из-за токсичности. Таким образом, менее токсичные, но менее эффективные заменители, такие как этанол, изопропанол, бутанол, МТБЭ, сложные эфиры уксусной

кислоты, гексан и различные комбинации растворителей, исследовались и изучаются многими исследователями для экстракции липидов микроводорослей. Таким образом, вышеуказанные методы должны быть проверены на коммерческую применимость и необходимы дальнейшие исследования в этой области для успешного внедрения этой технологии в промышленных масштабах.

*Методы отделения биомассы фототрофных микроорганизмов от культуральной жидкости.*

Так, известные методы разделения полученной биомассы фототрофных микроорганизмов, в том числе и цианобактерий, от культуральной среды, такие как центрифугирование, седиментационное осаждение, фильтрация, флокуляция, флотация и ультразвуковая обработка имеют свои преимущества и недостатки, влияющие на себестоимость данного процесса. Главные сложности данного этапа связаны с небольшими размерами клеток цианобактерий и низким их количеством в суспензии что затрудняет процесс их концентрирования. Кроме того, используемый метод должен сохранять жизнеспособность клеток с целью предотвращения изменения биохимического состава клеток, полученного в результате культивирования. Известно, что разделение при помощи центрифугирования характеризуется высоким потреблением энергии, метод фильтрации требует частую замену фильтров, мембран и длительное время проведения процесса. Седиментационное осаждение биомассы несмотря на низкое энергопотребление, тоже требует длительное время его проведения и дополнительно характеризуется низкой степенью разделения клеток от супернатанта, что безусловно ограничивает его промышленное применение. Метод разделения биомассы электрофлотацией требует частую замену электродов и большие затраты электроэнергии.

Эффективность разделения биомассы микроорганизмов методом электрокоагуляции успешно продемонстрирована в исследованиях Uduman и другие [85], которые изучали электрокоагуляцию микроводорослей с использованием различных типов электродов. При этом, ими определено

высокая эффективность использования алюминия, связанная по всей видимости с ее зарядом, которая обеспечивает большую вероятность образования агломератов за счет нейтрализации поверхностного заряда клеток.

Из всех известных методов наиболее широко используется метод концентрирования биомассы с использованием флокулянтов. Флокуляция микроорганизмов, в том числе цианобактерий возникает из-за нейтрализации заряда и снижения электростатических сил отталкивания между заряженными клетками в суспензии, так их отдельные клетки агрегируют с образованием более крупных частиц, которые осаждаются быстрее. Несмотря на то, что данный метод характеризуется высокой эффективностью и низкой стоимостью, зависимость эффективности применяемых в качестве флокулянтов солей различных металлов от внешних факторов требует дополнительных исследований и возможных модификаций данного метода.

Достаточно широко исследовано применение химических коагулянтов на концентрирование биомассы из суспензии, в том числе тетрахлорид титана и сернокислого марганца, гашеной извести. Однако недостатки применения химических коагулянтов связана с переходом части содержимого клеток фототрофных микроорганизмов в культуральную жидкость.

Подводя итоги по методам отделения биомассы фототрофных микроорганизмов, в том числе цианобактерий от культуральной жидкости, хочется отметить сложность, энергоемкость и длительность таких методов как центрифугирование, сепарирование, фильтрация и снижение качества получаемой продукции при использовании химических методов осаждения. Поэтому поиск эффективного способа разделения биомассы от культуральной суспензии все еще остается актуальной проблемой.

### 1.3. Перспективы и проблемы производства биодизеля на основе фототрофных микроорганизмов

Подводя итоги предыдущих разделов, отметим, что цианобактерии и микроводорослей обладают способностью производить большое количество различных необходимых

продуктов, в том числе и липиды. И наряду с микроводорослями их можно рассматривать как перспективные объекты для производства биодизеля благодаря правильному жирнокислотному составу и способности легко подвергаться различным генетическим манипуляциям.

Однако проведенный нами мониторинг основных узловых моментов разработки технологии преобразования биомассы цианобактерий в биотопливо свидетельствует о том, что, несмотря на перспективность их использования в качестве возобновляемого источника биомассы, в настоящее время промышленное производство таких биотоплив экономически не оправдано (рис. 14). Помимо проблемы увеличения продукции липидов отдельными штаммами цианобактерий важной проблемой является масштабирование процесса их культивирования. В то же время выращивание цианобактерий является одной из самых затратных частей любого производственного процесса, независимо от того, идет ли он в условиях фотобиореакторов или открытых прудов.




Рис.14. Мониторинг ключевых моментов разработки технологии преобразования цианобактериальной биомассы в биотопливо

Поэтому, несмотря на большой энергетический потенциал цианобактерий, на сегодняшний день производство биодизеля на их основе ограничено высокими затратами на его производство из-за дороговизны используемых ресурсов, в том числе воды, компонентов питательной среды и электроэнергии и т.д. Учитывая, что экономическая эффективность производства биотоплива из фототрофных микроорганизмов зависит от их крупномасштабной продуктивности, следует отметить, что самым большим препятствием на пути коммерциализации биотоплива из цианобактерий является сложность повторения продуктивного потенциала для крупномасштабного производства. Поэтому, несмотря на их потенциал для высокоскоростного производства биомассы по сравнению с наземным сырьем, осуществление этого процесса в больших масштабах может потребовать значительных усилий [86-90]

Проведенный рядом исследователей технико-экономический анализ целесообразности различных способов получения биотоплива на основе фототрофных микроорганизмов свидетельствует о большом разбросе расчетной стоимости топлива. Так, Benemann и другие [89] сообщают о низкой себестоимости производства в размере 1,65 долл. США/галлон, в то время как Ричардсон и др. (2012) сообщают о высоких производственных затратах в размере 33,16/галлона. Различия между представленными результатами можно объяснить различиями в способах обработки и моделировании существующих систем [91-93]. Метаанализ, проведенный Sun и другие (2011), чтобы согласовать усилия по моделированию проведенных исследований с опубликованными результатами, которые первоначально варьировались от 11,4/галлон до 27,10/ галлон привело к гораздо более близким диапазонам от 11,68 до 14,31 доллара за галлон, что свидетельствует о значительном снижении изменчивости из-за использования аналогичных условий выращивания и траектории производства. Значительные различия в стоимости также показаны между конкурирующими типами культивирования, ORP и PBR [94]. Исследования, сравнивающие эти две стоимости, пришли к выводу, что ORP является более рентабельным, чем PBR [95-100]. В работе Branyikova и другие [101], были изучены экономические затраты на биодизель для грузовых автомобилей производительностью

30 г/м$^2$/д и 15 г/м$^2$/д. Экономическая себестоимость 1 т/км топлива для грузовых автомобилей с биодизелем мощностью 30 г м2 д1 из цианобактерий при 100 % $CO_2$ (аммиачный завод) составила - 2,8 доллара, а для биодизеля при 15 % $CO_2$ (дымовые газы) составила – 2,2 доллара. При этом стоимость биодизеля из семян рапса составила, по их расчетам, 4,2 доллара. Мы также провели технико-экономический анализ этого производственного процесса, чтобы оценить стоимость биотоплива на основе фототрофных микроорганизмов. Они оценили стоимость в диапазоне от 25 долларов за галлон для низкой производительности (10 г/м$^2$/день при 15% TAG) до 2,50 долларов за галлон для высокой производительности (50 г/м$^2$/день при 50% TAG). Они определили, что только при высоких прогнозах продуктивности цена топлива на основе микроводорослей может быть конкурентоспособной с ценой на сою. Очевидно, что задача, стоящая перед коммерциализацией липидного топлива фототрофных микроорганизмов, заключается в достижении высокой производительности при дальнейшем снижении капитальных и эксплуатационных затрат. Так, по результатам анализа технико-экономических расчетов предполагается, что стоимость биотоплива из фототрофных микроорганизмов будет примерно в 6-10 раз выше, чем традиционного дизельного топлива.

Конечно, это ценовое сравнение является приблизительным, так как необходимо учитывать наличие ряда «скрытых затрат» на ископаемые виды топлива, которые не отражаются в цене дизельного топлива УЛС. капитальные затраты со временем в значительной степени списаны, кроме того, большинство правительств предоставляют субсидии и налоговые льготы на добычу нефти, и, таким образом, налогоплательщики несут косвенные затраты, которые напрямую не влияют на цену топлива. что расходы, которые несут правительства и отдельные лица в связи с воздействием ископаемого топлива на здоровье, также не отражаются в ценах на топливо [102].

Таким образом, при более низких объемах производства конечный продукт может быть дороже, чем ископаемое дизельное топливо, и потенциально даже дороже, чем биодизельное топливо из семян рапса. Для прибыльности требуется источник углекислого газа и высокая скорость

производства цианобактерий. Но следует учитывать, что несмотря на невысокую стоимость топлива УЛС, при очевидном удорожании ископаемого топлива, за счет его снижения технологические достижения в производстве биодизеля из фототрофных микроорганизмов, в том числе цианобактерий, могут быть весьма прибыльными. .

Для успешного производства биодизеля цианобактериями необходимо изучить дополнительные аспекты улучшения продуцентов с помощью генетических и метаболических подходов. В то же время развитие генной инженерии, высокопроизводительных технологий и достижений системной биологии с использованием полногеномных инструментов позволяет создавать штаммы цианобактерий с заданным генотипом и необходимым жирнокислотным составом.

Еще одним ключом к успешной коммерциализации биодизеля на основе цианобактерий является совершенствование способов эффективной переработки биомассы. Совершенствование методов разделения биомассы, выбор оптимальных растворителей и их соотношений являются важными ключевыми моментами, влияющими на результат и успех этой технологии. Кроме того, применяемые сегодня методы предполагают использование различных щелочных и кислотных катализаторов, имеющих такие недостатки, как сложность их выделения из конечных продуктов и высокие требования к качеству исходного сырья. Перспективными в этом направлении инновационными технологиями является использование биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов, обладающих рядом преимуществ перед катализаторами переэтерификации. Это низкая температура процесса, пригодная для использования и легко отделяемая от конечных продуктов. Все это будет способствовать значительному удешевлению технологического процесса получения биодизеля.

Технико-экономическая оценка производства биотоплива на основе фототрофных микроорганизмов свидетельствует о необходимости планирования и инвестирования новых мало- и безотходных технологий, позволяющих, с одной стороны, сделать антропогенный круговорот веществ более замкнутым, с другой стороны, существенно удешевить предлагаемую технологию. Таким образом, основной упор должен быть сделан

на интеграцию различных инновационных технологий. Примером такой интеграции является производство цианобактериального биодизеля при их культивировании в сточных водах. Такие мало- и безотходные технологии являются основой для комплексного преобразования солнечной энергии фототрофными микроорганизмами в биоэнергию, а впоследствии и в биотопливо. Так называемая WMC FWC Strategy Закон об устойчивом развитии предусматривает использование сточных вод в качестве питательной среды, а также промышленных дымовых газов для замены традиционных источников $CO_2$ при выращивании цианобактерий и микроводорослей. При этом могут использоваться различные виды сточных вод, в том числе бытовые сточные воды, сточные воды аквакультуры, сточные воды брожения, сточные воды бумажного производства и др. Несомненно, такие технологии снижают нагрузку на объекты окружающей среды и значительно экономят ресурсы и таким образом удешевить производство необходимой продукции, в том числе в сфере биоэнергетики.

Кроме того, субсидии и инвестиции должны быть направлены на развитие инфраструктуры для хранения, транспортировки и масштабирования биодизельных технологий. Значительная часть инвестиций должна быть направлена на высокоэффективные процессы переработки получаемого биодизельного продукта, которые требуют больших вложений в оборудование и современные передовые технологии. Такая политическая поддержка необходима, поскольку ясно, что производство биодизеля и расширение рынка его использования не произойдет до тех пор, пока не будет создана достаточная инфраструктура распределения и сбыта. Кроме того, существует острая необходимость внедрения передовых технологий для повышения эффективности производства биодизеля, снижения их себестоимости, что также требует устойчивых инвестиций. В целом создание технологической и технической базы для развития данной отрасли биоэнергетики, внедрение современных инженерных разработок и производство необходимого оборудования, а также финансирование региональных проектов в области производства энергии и тепла из биодизеля требует больших инвестиций и политической поддержки со стороны государства [103-104].

Все вышеперечисленное определяет влияние различных аспектов политики на рентабельность производства биодизеля во многих отраслях, включая сельское хозяйство, энергетику, транспорт, окружающую среду и торговлю. Разработка соответствующей политики и количественная оценка ее воздействия в конкретных случаях осложняются разнообразием инструментов политики и их применением. Однако во многих случаях это субсидии, направленные на поддержку биоэнергетики и влияющие на финансовую привлекательность ее производства, торговли и использования. Также следует отметить, что развитие современных тенденций на мировом рынке любого биотоплива сопровождается развитием противоречий субъектов всех уровней от государства до отдельных хозяйственных структур и потребителей, в которых проявляются экономические, экологические и социальные последствия Внедрение биотоплива остается предметом обширных споров [105-109].

Таким образом, биотопливо из фототрофных микроорганизмов представляет собой сложный предмет, включающий такие аспекты, как экономика, экология, микробиология, биохимия, генетика, химическая технология и политика. Конечно, полная замена ископаемого топлива биотопливом не считается достижимой, но, тем не менее, современному биотопливу предстоит сыграть решающую роль в долгосрочной перспективе, чтобы помочь ограничить рост выбросов парниковых газов и привести к переходу нынешнего нефтяного общества на более устойчивое топливо. По оценкам экспертов, к 2030 году мировое производство биотоплива может быть доведено до 150 млн тонн нефтяного эквивалента с ежегодным темпом роста 7-9%. Его доля составит 4-6% от общего объема топлива, потребляемого транспортным сектором. В то же время биотопливо третьего и четвертого поколения, хотя и находятся еще на ранних стадиях разработки, могут ежегодно заменять более 70 млрд литров ископаемого топлива с вероятным максимальным периодом развития в период 2025-2035 гг. [110-116].

**Список использованных источников**

1. Nehring R (2009) Traversing the mountaintop: world fossil fuel production to 2050. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364(1532):3067–3079.

2. Kumar N (2017) Oxidative stability of biodiesel: Causes, effects and prevention. Fuel 190:328–350.

3. Kumar RR, Rao PH (2015) Arumugam M. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. Front. Energy Res. 6(2).

4. Kumar A, Kaushal S, Saraf SA, Singh JS (2018) Microbial bio-fuels: a solution to carbon emissions and energy crisis. Front. Biosci 23:1789–1802.

5. Kumar SPJ, Banerjee R (2019) Enhanced lipid extraction from oleaginous yeast biomass using ultrasound assisted extraction: A greener and scalable process. Ultrasonics Sonochemistry 52:25–32.

6. Liew WH, Hassim MH, Ng DKS (2014) Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. J Clean Prod 71:11–29.

7. Ghasemi Y, Rasoul-Amini S, Naseri AT, Montazeri-Najafabady N, Mobasher MA, Dabbagh F (2012) Microalgae biofuel potentials (review). Appl Biochem Microbiol 48:126–44.

8. Sukenik A, Yamaguchi Y, Livne A (1993) Alterations in lipid molecular species of the marine eustigma tophyte *Nannochlorosis* Sp.1. J Phycol 29:620–6.

9. Torres CM, Ríos SD, Torras C, Salvadó J, Mateo-Sanz JM, Jiménez L (2013) Microalgaebased biodiesel: a multicriteria analysis of the production process using realistic scenarios. Bioresour Technol 147:7–16.

10. Chen C-Y, Zhao X-Q, Yen H-W, Ho S-H, Cheng C-L, Lee D-J (2013) Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. Biochem Eng J 78:1–10.

11. Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM (2012) High lipid induction in microalgae for biodiesel production. Energies 5:1532.

12. Sajjadi B, Raman AAA, Arandiyan H (2016) A comprehensive review on properties of edible and non-edible vegetable oil-based biodiesel: composition, specifications and prediction models. Renew Sustain Energy Rev 63:62–92.

13. Roberts LG, Patterson TJ (2014) Biofuels Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), Academic Press, Pages 469–475.

14. Khan MI, Shin JH, Kim JD (2018) The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. Microbial cell factories 17(1):36.

15. Maheshwari N, Kumar M, Thakur IS, Srivastava S (2018) Carbon dioxide biofixation by free air $CO_2$ enriched (FACE) bacterium for biodiesel production. J $CO_2$ Util 27:423–432

16. Sheng J (2011) Downstream Processing of Synechocystis for Biofuel Production. Thesis. Arizona State University. December.

17. Hewelt-Belka W, Kot-Wasik Á, Tamagnini P, Oliveira P. Untargeted Lipidomics (2020) Analysis of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Lipid Composition Variation in Response to Alternative Cultivation Setups and to Gene Deletion. Int J Mol Sci 21:8883.

18. Kalavathi DF, Subramanian Uma G (2001) Degradation and metabolization of the pigment-melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. Enzym Microb Technol 29:246–251.

19. Shashirekha VMR, Sridharan M (2008) Swamy. Biosorption of trivalent chromium by free and immobilized blue green algae: kinetics and equilibrium studies. J. Environ. Sci. Health. A Toxicol. Hazard Subst. Environ. Eng 43:390–401.

20. Uma PL (2009) Laccase and polyphenol oxidase activities of marine cyanobacteria: a study with Poly R 478 decolourization. World J. Microbiol. Biotechnol 26:63–69.

21. Kalaivani SBT, Rajasekaran C, Shalini M, Siva R, Singh RK, Akthar MA (2014) *Arthrospira* (Spirulina) species as bioadsorbents for lead, chromium, and cadmium–a comparative study. Clean (Weinh) 42:1790–1797.

22. Dellamatrice PM, Silva-Stenico ME, Moraes Beraldo LA, Fiore MF, Rosim RT (2017) Monteiro Degradation of textile dyes by cyanobacteria. Braz. J. Microbiol 48 (1):25–31.

23. Singh JS (2015a) Microbes: the chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. Agric. Ecosyst. Environ 203:80–82.

24. Singh JS (2015b) Plant-microbe interactions: a viable tool for agricultural sustainability Appl. Soil Ecol 92:45–46.

25. Aratboni AH, Rafiei N, Garcia-Granados R, Alemzadeh A, Morones-Ramírez JR (2019) Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. Microb Cell Fact 18(1):178

26. Abdelhamid SA, Hussein AA, Asker MS (2019) Optimization of culture conditions for biodiesel production from Egyptian isolate *Penicillium commune* NRC2016. Bull Natl Res Cent 43:15.

27. Bolatkhan K, Sadvakasova AK, Zayadan BK, Kakimova AB, Sarsekeyeva FK, Kossalbayev BD, Bozieva AM, Alwasel S, Allakhverdiev SI (2020) Prospects for the creation of a waste-free technology for wastewater treatment and utilization of carbon dioxide based on cyanobacteria for biodiesel production. Journal of Biotechnology 324:162–170.

28. Rajeshwari KR; Rajashekhar M (2011) Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of Western Ghats, Southern India. Braz. arch. biol. technol. Curitiba 54 (5):849–857.

29. Hossain MF, Ratnayake RR, Mahbub S, Kumara WKL, Magana-Arachchi DN (2020) Identification and culturing of cyanobacteria isolated from freshwater bodies of Sri Lanka for biodiesel production. Saudi Journal of Biological Sciences 27(6):1514–1520.

30. Palanisamy KM, Paramasivam P, Jayakumar S, Maniam GP, Rahim AMH, Govindan N (2021) Economical cultivation system of microalgae *Spirulina platensis* for lipid production. OP Conf. Series: Earth and Environmental Science 641:12022.

31. Han F, Pei H, Hu W, Jiang L, Cheng J, Zhang L (2016) Beneficial changes in biomass and lipid of microalgae *Anabaena variabilis* facing the ultrasonic stress environment. Bioresource Technology 209:16–22.

32. Eungrasamee K, Incharoensakdi A, Lindblad P (2020) *Synechocystis* sp. PCC 6803 overexpressing genes involved in CBB cycle and free fatty acid cycling enhances the significant levels of intracellular lipids and secreted free fatty acids. Sci Rep 10:4515.

33. Yalcin D, Hoffmann W (2020) Growth, lipid content, and fatty acid profile of freshwater cyanobacteria Dolichospermum affine (Lemmermann) by using modified nutrient media. Aquacult Int 28:1371–1388.

34. Nagappan S, Bhosale R, Duc Nguyen D, Pugazendhi A, Tsai PC, Chang SW, Ponnusamy VK, Kumar G (2020) Nitrogen-fixing cyanobacteria as a potential resource for efficient biodiesel production Fuel 279:118440.

35. El Fatah HMA, El-Baghdady KZ, Zakaria AE, Sadek HN (2020) Improved lipid productivity of Chlamydomonas globosa and Oscillatoria pseudogeminata as a biodiesel feedstock in artificial media and wastewater. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 25:101588.

36. Blažina M, Haberle I, Hrusti E, Budiša A, Petri I, Konjevi L, Šilovi T, Djakovac T, Gecek S (2019) Growth Aspects and Biochemical Composition of *Synechococcus* sp. MK568070 Cultured in Oil Refinery Wastewater. Journal of Marine Science and Engineering 7 (164).

37. Peng Z, Feng L, Wang X, Miao X (2019) Adaptation of *Synechococcus* sp. PCC 7942 to phosphate starvation by glycolipid accumulation and membrane lipid remodeling. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids 1864(12):158522.

38. Oliveira DT, Vasconcelos CT, Feitosa AMT, Aboim JB, Oliveir AN, Xavier LP, Santos AS, Gonçalves EC, Filho GNR, Nascimento LAS (2018) Lipid profile analysis of three new Amazonian cyanobacteria as potential sources of biodiesel 234(5):785–788.

39. Derakhshandeh M, Atici T, Umran TUN (2019) Lipid extraction from microalgae Chlorella and Synechocystis sp. using glass microparticles as disruption enhancer. Energy & Environment 30(8):1341–1355.

40. Cordeiro RS, Vaz ICD, Magalhães SMS, Barbosa FAR (2017) Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. An Acad Bras Cienc 89:2021–2031.

41. Jawaharraj K, Karpagam R, Ashokkumar B, Kathiresan S, Moorthy IMG, Arumugam M, Varalakshmi P (2017) Improved biomass and lipid production in Synechocystis sp. NN using

industrial wastes and nano-catalyst coupled transesterification for biodiesel production. Bioresour Technol 242:128–132.

42. Wang Q, Oshita K, Takaoka M (2021) Effective lipid extraction from undewatered microalgae liquid using subcritical dimethyl ether. Biotechnol Biofuels 14:17.

43. Wang X., Xiong X, Sa N (2016) Metabolic engineering of enhanced glycerol-3-phosphate synthesis to increase lipid production in Synechocystis sp. PCC 6803. Appl Microbiol Biotechnol 100:6091–6101.

44. Silva CSP, Silva-Stenico ME, Fiore MF, Castro HF, Rós PCM (2014) Optimization of the cultivation conditions for Synechococcus sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. Algal Research 3:1–7.

45. Cai T (2012) Cultivation of Nannochloropsis salina and Synechocystis sp. PCC6803 in Anaerobic Digestion Effluent for Nutrient Removal and Lipid Production. THESIS. The Ohio State University.

46. El-Ardy O, El-Enin SAA, El Semary NA, El Diwani G (2012) Microalgal culture in photo-bioreactor for biodiesel production: case studies from Egypt. Afinidad LXIX, 558, Abril – Junio.

47. Sheng J, Vannela R, Rittmann BE (2011) Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. Bioresour Technol 102:1697–1703.

48. Wahlen BD, Willis RM, Seefeldt LC (2011) Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. Bioresource Technology 102(3):2724–2730.

49. Ryckebosch E, Bruneel C, Muylaert K, Foubert I (2012) Microalgae as an alternative source of omega- 3 long chain polyunsaturated fatty acids. Lipid Technol 24(6):128–130.

50. Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R, Halden RU (2008) Pre-genomic, genomic and post-genomic study of microbial communities involved in bioenergy. Nat Rev Microbiol 6(8):604–612.

51. Nagarkar S, Williams GA, Subramanian G, Saha SK (2004) Cyanobacteria-dominated biofilms: a high quality food resource for intertidal grazers. Hydrobiologia512:89–95.

52. Deshmukh S, Bala K, Kumar R (2019) Selection of microalgae species based on their lipid content, fatty acid profile and apparent fuel properties for biodiesel production. Environ Sci 26(24):24462–24473.

53. Gopinath A, Sairam K, Velraj R, Kumaresan G (2015) Effects of the properties and the structural configurations of fatty acid methyl esters on the properties of biodiesel fuel: a review. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: Journal of Automobile Engineering 229(3):357–390.

54. Lu X (2010) A Perspective: Photosynthetic Production of Fatty Acid-Based Biofuels in Genetically Engineered Cyanobacteria. Biotechnology Advances 28:742–746.

55. Parker PL, van Baalen C, Maurer L (1967) Fatty Acids in Eleven Species of Blue-Green Algae: Geochemical Significance. Science 155:707–708.

56. Oren A, Fattom A, Padan E, Tietz A (1985) Unsaturated Fatty Acid Composition and Biosynthesis in *Oscillatoria limnetica* and Other Cyanobacteria. Archives of Microbiology 141:138–142.

57. Sarsekeyeva F, Usserbaeva A, Zayadan B, Mironov K, Sidorov R, Kozlova A, Kupriyanova E, Sinetova M, Los D (2014) Isolation and Characterization of a New Cyanobacterial Strain with a Unique Fatty Acid Composition. Advances in Microbiology 4:1033–1043.

58. Maslova IP, Mouradyan EA, Lapina SS, Klyachko-Gurvich GL, Los DA (2004) Lipid fatty acid composition and thermophilicity of cyanobacteria. Russ. J. Plant Physiol 51:353–360.

59. Chi X, Yang Q, Zhao F, Qin S, Yang Y, Shen J, Lin H (2008) Comparative Analysis of Fatty Acid Desaturases in Cyanobacterial Genomes. Comparative and Functional Genomics 284508:25.

60. Temina M, Rezankova H, Rezanka T, Dembitsky VM (2007) Diversity of the fatty acids of the Nostoc species and their statistical analysis. Microbiol Res 162(4):308–21.

61. Behnam T, Afua A, Alok SK, Singh PK, Sitther V (2020) Nitrogen Deprivation in Fremyella diplosiphon Augments Lipid Production without Affecting Growth. Energies 21:5769.

62. Rosgaard L, de Porcellinis AJ, Jacobsen JH, Frigaard N, Sakuragi Y (2012) Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. J Biotechnol 162:134–147.

63. Ruffing AM, Jones HD (2012) Physiological effects of free fatty acid production in genetically engineered Synechococcus elongatus PCC 7942. Biotechnol Bioeng 109(9):2190–2199.

64. Santos-Merino M, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F (2018) Engineering the fatty acid synthesis pathway in Synechococcus elongatus PCC 7942 improves omega-3 fatty acid production. Biotechnol Biofuels. Sep 5(11):239.

65. Radakovits R, Jinkerson RE, Darzins A, Posewitz MC (2010) Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. Eukaryotic cell 9(4):486–501.

66. Liu X, Sheng J, Curtiss R (2011) Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(17):6899–6904.

67. Liu X, Sheng J, Curtiss R (2011) Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(17):6899–6904.

68. Loura IC, Dubacq JP, Thomas JC (1987) The Effects of Nitrogen Deficiency on Pigments and Lipids of Cyanobacteria. Plant Physiology 83(4):838–843.

69. Rathore DS, Kumar A, Kumar HD (1993) Lipid content and fatty acid composition in $N_2$-fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* as affected by molybdenum deficiency. World J Microbiol Biotechnol 9:508–510.

70. Mondal M, Goswami S, Ghosh A (2017) Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. Biotech 7:99.

71. Molazadeh M, Ahmadzadeh H, Pourianfar HR, Lyon S, Rampelotto PH (2019) The Use of Microalgae for Coupling Wastewater Treatment With $CO_2$ Biofixation. Frontiers in bioengineering and biotechnology 7:42.

72. Lal A, Ghosh S, Das D (2018) Improvement in electrically induced biomass harvesting of Chlorella sp. MJ 11/11 for bulk biomass production. J Appl Phycol 30:979–993.

73. Jeevanandam J, Harun MR, Lau SY, Sewu DD, Danquah MK (2020) Microalgal Biomass Generation via Electroflotation: A Cost-Effective Dewatering Technology. Applied Sciences 10(24):9053.

74. Cheng CH, Du TB, Pi HC, Jang SM, Lin YH, Lee HT (2011) Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical $CO_2$. Bioresour Technol 102(21):10151–10153.

75. Samarasinghe N, Fernando S, Faulkner B (2012) Effect of High Pressure Homogenization on Aqueous Phase Solvent Extraction of Lipids from Nannochloris Oculata Microalgae. Journal of Energy and Natural Resources 1(1):1–7.

76. Kim J,. Lingaraju BP, Rheaume R, Lee J-Y, Siddiqui KF (2010) Removal of Ammonia from Wastewater Effluent by Chlorella Vulgaris. Tsinghua Science & Technology 15(4):391–396.

77. Wu X, Joyce EM, Mason TJ (2011) The effects of ultrasound on cyanobacteria. Harmful Algae 10(6):738–743.

78. Keris-Sen UD, Sen U, Soydemir G, Gurol MD (2014) An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. Bioresour Technol 152:407–413.

79. Kaiwan-arporn P, Hai PD, Thu NT, Ajit P (2012) Annachhatre. Cultivation of cyanobacteria for extraction of lipids. Biomass and Bioenergy 44:142–149.

80. Qv XY, Zhou QF, Jiang JG (2014) Ultrasound-enhanced and microwave-assisted extraction of lipid from *Dunaliella tertiolecta* and fatty acid profile analysis. J Sep Sci. 37(20):2991–2999.

81. Wahidin S, Idris A, Shaleh SRM (2013) The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae Nannochloropsis sp. Bioresource Technology 129:11.

82. Maffei G, Bracciale MP, Broggi A, Zuorro A, Santarelli ML, Lavecchia R (2018) Effect of an enzymatic treatment with cellulase and mannanase on the structural properties of Nannochloropsis microalgae. Bioresource Technology 249:592–598.

83. Ren X, Zhao X., Turcotte F, Deschênes JS, Tremblay R, Jolicoeur M (2017) Current lipid extraction methods are significantly enhanced adding a water treatment step in Chlorella protothecoides. Microbial cell factories 16(1):26

84. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D (2008) Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. J Lipid Res. 49(5):1137–1146.

85. Uduman N, Bourniquel V, Danquah MK, Hoadley AFA (2011) A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production. Chemical Engineering Journal 174(1):249–257.

86. Ashokkumar V, Chen W-H, Ngamcharussrivichai C, Agila E, Ani FN (2019) Potential of sustainable bioenergy production from Synechocystis sp. cultivated in wastewater at large scale – A low cost biorefinery approach. Energy Conversion and Management 186:188–199.

87. Babu V, Thapliyal A, Kumar PG (2013) Biofuels Production. DOI:10.1002/9781118835913

88. Balan V (2014) Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. ISRN biotechnology, 463074.

89. Benemann JR, Oswald WJ (1996) Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of $CO_2$ to biomass. Final report 97:004328.

90. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S (2019). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. New microbes and new infections 34:100622.

91. Richardson JW, Johnson MD, Outlaw JL (2012) Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the southwest. Algal Research 1(1):93–100.

92. Salvo RD, Reich A, Dykes HWH, Teixeira RJR (2010) Lipid extraction from microalgae using a single ionic liquid. Pat. no. 8450111 US 12/970, 484.

93. Soydemir G, Keris-Sen UD, Sen U (2016) Biodiesel production potential of mixed microalgal culture grown in domestic wastewater. Bioprocess Biosyst Eng 39:45–51.

94. Sun A, Davis R, Starbuck M, Ben-Amotz A, Pate R, Pienkos PT (2011) Comparative cost analysis of algal oil production for biofuels, Energy 36(8):5169–5179.

95. Politaeva N, Smyatskaya Y, Toumi A, Oparina A (2018) Concentration of Chlorella Sorokiniana Microalga Biomass at Combined Usage of Coagulants and Flocculants. Eurasian Chem.-Technol J 20(3):243–247.

96. The BEFS Analytical Framework. 2010. http://www.fao.org/3/i1968e/i1968e.pdf

97. Topare NS., Raut SJ, Renge VC, Khedkar SV, Chavan YP, Bhagat SL (2011) Extraction of oil from algae by Solvent extraction and oil expeller method. Int J Sci 9(4):1746–1750.

98. Tran HL, Hong SJ, Lee CG (2009) Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from Botryococcus braunii LB 572 and Synechocystis sp. PCC 6803. Biotechnol Bioproc E 14:187–192.

99. Vandamme D, Foubert I, Muylaert K (2013) Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. Trends in Biotechnology 31(4):233–239.

100. Boretti A., Rosa L (2019) Reassessing the projections of the World Water Development Report. Clean Water 2:15.

101. Branyikova I, Prochazkova G, Potocar T, Jezkova Z, Branyik T (2018) Harvesting of Microalgae by Flocculation. Fermentation 4(4):93.

102. Comar CL, Nelson N (1975) Health effects of fossil fuel combustion products: report of a workshop. Environmental Health Perspectives12:149–170.

103. Debnath M, Mandal NC, Ray S (2012) Effect of fungicides and insecticides on growth and enzyme activity of four cyanobacteria. Indian journal of microbiology 52(2):275–280.

104. Dmytryk A, Saeid A, Chojnacka K (2014) Biosorption of Microelements by Spirulina: Towards Technology of Mineral Feed Supplements. The Scientific World Journal 356328:15.

105. El-Sheekh MM, El-Shouny WA, Osman ME (2014) Treatment of sewage and industrial wastewater effluents by the cyanobacteria Nostoc muscorum and Anabaena subcylinderica. J. Water Chem. Technol 36:190–197.

106. Gasparatos A, Stromberg P, Takeuchi K (2013) Sustainability impacts of first-generation biofuels. Animal Frontiers 3(2):12–26.

107. Griffiths MJ, Harrison STL (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. J Appl Phycol 21:493–507.

108. Gupta R, Ahuja P, Khan S, Saxena R, Mohapatra H (2000) Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. Current Science 78(8):967–973.

109. Haedrich J, Stumpf C, Denison MS (2020) Rapid extraction of total lipids and lipophilic POPs from all EU-regulated foods of animal origin: Smedes' method revisited and enhanced. Environ Sci Eur 32:118.

110. Ichor T, Okerentugba PO, Okpokwasili GC (2016) Biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbon by a Consortium of Cyanobacteria Isolated from Crude Oil Polluted Brackish Waters of Bodo Creeks in Ogoniland. Rivers State. Research Journal of Environmental Toxicology 10:16–27.

111. Kamilya D, Sarkar S, Maiti TK, Bandyopadhyay S, Mal BC () Growth and nutrient removal rates of Spirulina platensis and Nostoc muscorum in fish culture effluent: a laboratory- scale study. Aquaculture Research 37(15):1594 –1597.

112. Lau NS, Matsui M, Abdullah AA (2015) Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. BioMed research international 754934.

113. Milledge JJ, Heaven S (2014) Methods of energy extraction from microalgal biomass: a review. Rev Environ Sci Biotechnol 13:301–320.

114. Mostafa SSM (2012) Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications. Plant Science. DOI: 10.5772/53694

115. Patel VK, Sundaram S, Patel AK (2018) Characterization of Seven Species of Cyanobacteria for High-Quality Biomass Production. Arab J Sci Eng 43:109–121.

116. Pienkos PT, Darzins A (2009) The promise and challenges of microalgal- derived biofuels. Biofuels, Bioproducts and Biorefining 3(4):431–440.

## 2. ПОЛУЧЕНИЕ БИОВОДОРОДА НА ОСНОВЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

В связи с тем, что использование ископаемых источников энергии влечет за собой различные проблемы загрязнения окружающей среды, в настоящее время существует необходимость разработки новых экологически приемлемых энергетических технологий, основанных на использовании возобновляемых источников энергии, способных в свою очередь заменить невозобновляемые энергоресурсы по мере их истощения и удорожания [1]. Расширяя сферу переработки биологического сырья в биотопливо, человечество тем самым одновременно снижает экологическую нагрузку на природу, уменьшает загрязнение территорий и водоёмов, а также уменьшает эмиссию метана в атмосферу Земли [2].

Интересы учёных в настоящее время обращены к поистине неисчерпаемым сырьевым источникам для производства биотоплива, в том числе к воде для получения водорода путём её биофотолиза или фотокаталитического разложения. В сфере использования биотоплива водород является самым чистым и ценным из производимых видов топлива, и может быть наиболее перспективным кандидатом на роль экологически чистого и возобновляемого энергоносителя будущего. На сегодняшний день, его основное производство связано с реализацией различных термохимических процессов. Однако огромный научно-практический интерес и актуальность представляет собой биологический способ его получения, поскольку это позволяет избежать как использования ископаемого топлива, запасы которых из года в год неуклонно снижаются, так и загрязнения окружающей среды, являющегося следствием использования традиционных источников энергии.

Из числа методов получения водорода биологическим путем наиболее перспективным является процессы с использованием фотосинтезирующих микроорганизмов, в том числе цианобактерий. Использование цианобактерий, как возможных продуцентов водорода представляется особенно актуальным и выгодным, поскольку они образуют водород за счёт конверсии солнечной энергии и не требуют сложных

дорогостоящих питательных сред. При этом способностью как продуцировать, так и в последствии выделять молекулярный водород обладают большинство их видов, разнообразных по морфологии. Необходимо отметить, что морфологические и метаболические особенности цианобактерий делают их наиболее перспективными продуцентами водорода. В особенности это касается гетероцистных форм цианобактерий, у которых процессы выделения кислорода и водорода пространственно разделены. Благодаря этим особенностям гетероцистные цианобактерии, способные выделять водород в присутствии молекулярного кислорода в воздушной атмосфере, могут осуществлять светозависимое выделение водорода. Этот процесс привлекает к себе внимание в связи с фактической неисчерпаемостью и возобновляемостью как солнечной энергии, так и субстрата – воды, а также нетоксичностью побочного продукта – кислорода. Скорость выделения водорода цианобактериями определяется генетической способностью синтезировать необходимые ферменты, а также внутренними и внешними метаболическими условиями и условиями окружающей среды, обеспечивающими необходимую энергию. Таким образом, цианобактерии являются перспективными биологическими системами для преобразования солнечной энергии. Однако, как известно, существует немало ограничений, таких как кислородная чувствительность основных ферментов водородного метаболизма, нестабильность самого процесса выделения водорода и т.д., что делает возможным получение водорода цианобактериями пока только в лабораторных условиях. Использованием различных методов генетической и метаболической инженерии, а также улучшением техологических характеристик фотобиореакторов используемых для их культивирования продуцентов водорода, можно значительно усилить фотобиологическое производство водорода из цианобактерий.

Данный раздел рассматривает современное состояние исследований в области выделения водорода цианобактериями, в том числе представлены сведения о механизмах образования ими водорода, ферментах, катализирующих этот процесс и факторах, стимулирующих выход водорода. Обсуждаются

перспективы и проблемы в производстве водорода цианобактериями, генетические и метаболические подходы увеличения продуктивности производства водорода клетками цианобактерий. Представлены данные о конструкции фотобиореакторов используемых для их культивирования.

### 2.1. Биопроцессы образования водорода клетками цианобактерий с использованием световой энергии

Биохимическое производство водорода, как побочного продукта метаболизма микроорганизмов, является сравнительно новой областью технологических разработок, которая открывает новые потенциальные возможности для получения водорода из возобновляемых ресурсов. Не смотря на то, что возможность протекания таких реакций в живых организмах была показана более чем полвека назад, процесс биофотолиза, осуществляемый цианобактериями, активно изучается на протяжении последних 35 лет [3]. За это время были выяснены основные молекулярные механизмы образования водорода живыми системами.

Системы биофотолиза воды, имеющие два общих элемента, такие как электронтранспортную цепь фотосинтеза, включающую систему разложения воды и катализаторы образования водорода, концептуально рассматриваются, как прямой и непрямой биофотолиз. Как известно, процесс прямого биофотолиза предполагает использование энергии света, поглощенноого фотосинтетическим аппаратом, на расщепление воды с образованием кислорода и на генерацию низкопотенциальных восстановителей, с последующим восстановлением протонов и образованием водорода (Рисунок 1). При прямом биофотолизе фотосинтетически продуцируемый восстановитель, или ферредоксин, или НАДФН, непосредственно восстанавливает гидрогеназу. При непрямом биофотолизе продукты фотосинтетичсекого расщепления воды и последующего восстановления ферредоксина используются для фиксации углекислого газа, а полученное в результате восстановленное соединение углерода может быть использовано для стимулирования выделения водорода в отдельной реакции (Рис. 1).

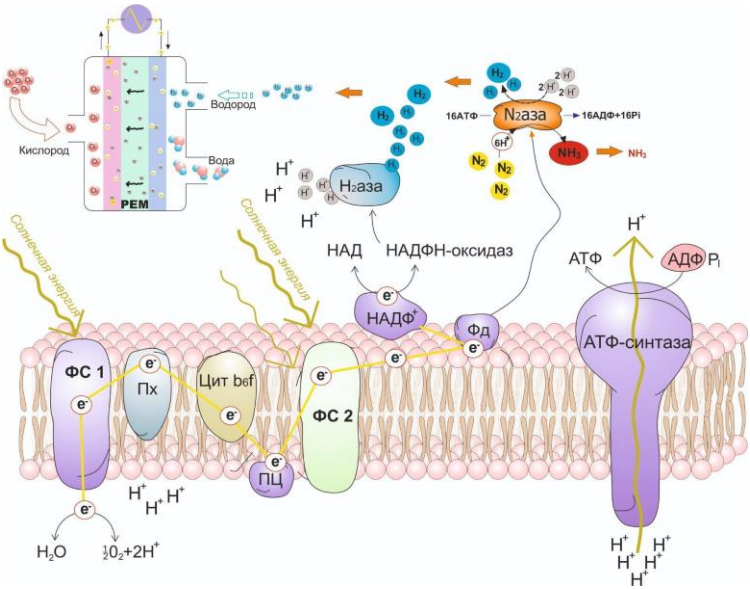



Рис. 1. Механизм производства водорода цианобактериями. Сокращения: ФС 1 - фотосистема 1, ФС 2 - фотосистема 2, Пх - пластохинон, Цит $b_6f$ - Цитохром-b6f-комплекс, Пц - пластицианин, НАДФ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат, Фд - ферродоксин, $H_2$аза - фермент гидрогеназа, $N_2$ - фермент нитрогеназа, АТФ - аденозинтрифосфат, АДФ - аденозиндифосфат, PEM - полимерно-электролитная мембрана (ПОМ) [3].

Прямой биофотолиз использует способность фототрофных микроорганизмов расщеплять воду на кислород и протоны посредством фотосинтеза и таким образом превращает солнечную энергию в химическую энергию в форме водорода. У водорослей появилась способность высвобождать протоны и электроны в процессе расщепления воды с использованием солнечной энергии. Водород образуется в результате прямого поглощения света и переноса электронов к двум различным ферментам, а именно гидрогеназам и нитрогеназам [4]. В отсутствии кислорода (анаэробные условия) или когда накапливается избыточная энергия, фотосинтетические микробы высвобождают избыточные электроны, используя фермент гидрогеназу, который превращает $H^+$ в $H_2$.

Исследование показало, что электроны и протоны, выбрасываемые в результате реакций расщепления воды, повторно смешиваются с хлоропластной гидрогеназой с образованием высокочистого $H_2$ (до 98%), реакция показана ниже [5-19].

$$2H_2O + \text{Солнечная энергия} \rightarrow 2H_2 + O_2$$

Непрямой биофотолиз является вариантом прямого процесса, при котором, фотосинтез расщепления воды и последующее восстановление ферредоксина используются для фиксации углекислого газа, а полученное в результате восстановленное соединение углерода может быть использовано для стимулирования выделения водорода в отдельной реакции. Этот процесс протекая в два этапа разделяет стадии выделения кислорода и водорода, как в пространстве, так и во времени, во избежание кислородного ингибирования.

Согласно опубликованным статьям, *Oscillatoria* sp. 23 [19] и *Oscillatoria chalybea* [20] продемонстрировали фотопродукцию молекулярного $H_2$ посредством прямого биофотолиза, а *Anabaena* sp. UTEX 1448 синтезирует большое количество $H_2$ путем прямого и непрямого биофотолиза в течение 12 часов [21]. Согласно Tuloupakis и другие [22], иммобилизация *Synechocystis* sp. PCC 6803 в процессе непрямого биофотолиза активно продуцировал H2 с максимальной скоростью 40,6 ± 4,9 ммоль/мг хл/ч.

Однако следует отметить, что, несмотря на имеющиеся значительные достижения в изучении процессов прямого и непрямого биофотолиза за последние годы, все еще существуют трудности, ограничивающие использование цианобактерий для преобразования такими путями солнечной энергии [23]. Помимо решения проблем, связанных с одновременным выделением кислорода и $H_2$, обеспечивающего таким образом высокую чувствительность процесса к кислороду, необходимы фундаментальные исследования связанные с увеличением эффективности выделения водорода фотосинтезирующими культурами и повышением скорости реакции данного процесса. В связи с этим исследования, направленные на повышение

скорости высвобождения $H_2$ фотосинтетическими микроорганизмами, в настоящее время очень актуальны [24, 25]. Как правило, исследования в этой области должны быть направлены на поиск новых и более продуктивных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов, которые активно продуцируют $H_2$, и оптимизации процесса культивирования с целью повышения эффективности превращения субстрата в $H_2$. Что наиболее важно, необходим подход для повышения эффективности и стабильности продукции $H_2$ цианобактериями.

Цианобактерии являются одной из групп фотосинтезирующих микроорганизмов, подходящих для фотобиологического производства водорода. Ряд цианобактерий, принадлежащих к родам *Nostoc*, *Anabaena*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Synechococus*, *Phormidium* и т. д., могут содержать фермент гидрогеназу для производства водорода. Они могут расти на простых питательных средах, благодаря способности выделять $CO_2$ из атмосферы в качестве источника углерода, и многие штаммы способны восстанавливать атмосферный $N_2$ до аммиака, а также использовать солнечный свет как единственный источник энергии для производства водорода. Удивительные свойства, присущие цианобактериям, проявляющиеся в их способности к жизни в разнообразных, порой экстремальных условиях, фотосинтез с участием необычных пигментов, азотфиксация, выделение разнообразных веществ в культуральную жидкость, своеобразное отношение к кислороду – все это определяется необычным строением протопласта, пластичностью метаболизма и уникальной ферментной системой их клеток.

Известно, что ферментная система метаболизма водорода и его регуляции у цианобактерий включает следующие группы ферментов: нитрогеназы и гидрогеназы (рисунок 2). Нитрогеназы катализируют образование водорода одновременно с восстановлением азота до аммиака. Гидрогеназы катализируют простейшую химическую реакцию, обратимое восстановление водорода из протонов и электронов. И те, и другие ферменты являются ключевыми клеточными ферментами, ответственными за биологическое производство водорода в цианобактериях. Однако нитрогеназа, в отличие от

гидрогеназы, катализирует необратимый процесс, что считается более перспективным.

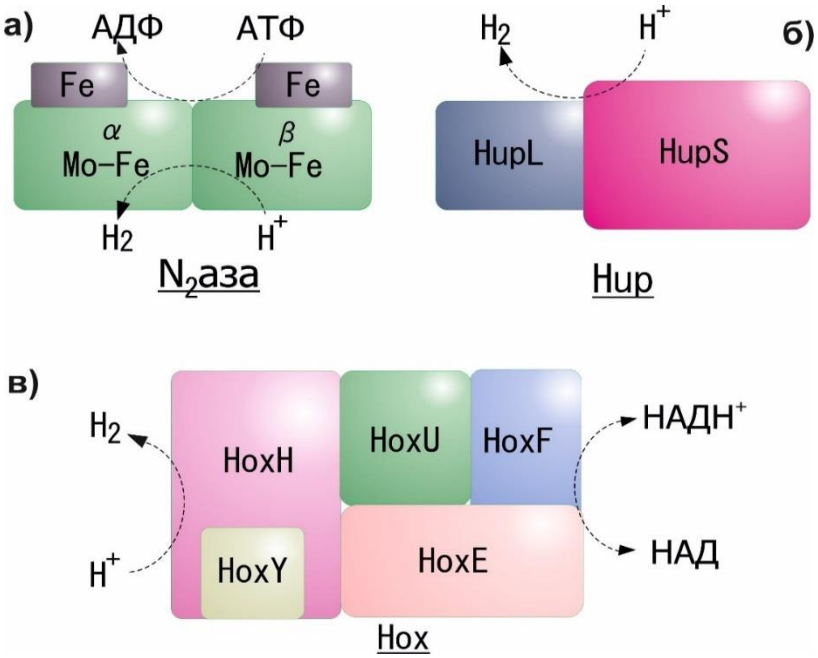



Рис. 2. Цианобактериальные ферменты, участвующие в метаболизме водорода (а) Нитрогеназа состоит из двух специфических белковых компонентов: белок Mo-Fe, комплекс α2 β2, который содержит два кластера P и Fe-MoCo, где происходит восстановление субстрата, и белок Fe, специфическая редуктаза для Mo-Fe белок. При этом, производство водорода требует гидролиза АТФ который нитрогеназой синтезируется только при отсутствии азота. (б) Hup-гидрогеназа представлена никель-железной гидрогеназой, которая готова к окислению водорода. (в) Hox система также является никель-железной гидрогеназой, которая взаимодействует с пиридиндинуклеотидами ($НАД^+$, $НАДН^+$), и может катализировать восстановление протонов или окисление водорода в зависимости от состояния клеточного метаболизма. Она отвечает за выделение водорода во время темновой ферментации, а также за выброс водорода, наблюдаемый при повторном освещении адаптированных к темноте культур.

Все зеленые микроводоросли и цианобактерии имеют эти ферменты, однако их активность, созревание ферментов и структурное разнообразие могут различаться у разных видов. Кроме того эти ферменты могут быть конститутивными либо индуцибельными. Клетка может содержать гены различных по функциям гидрогеназ и активировать синтез фермента, необходимого в данных условиях.

*Нитрогеназы.*

Нитрогеназа многосубъединичный, многосубстратный, сложный фермент, отвечающий за фиксацию азота и обнаруживается в основном среди прокариот, катализирует всю биохимическую фиксацию $N_2$, обеспечивая преобразование около 60% фиксированного N из $N_2$ в глобальный биогеохимический азотный цикл. Нитрогеназа способна использовать аденозинтрифосфат магния (MgАТФ) и электроны, чтобы восстановить множество субстратов (включая протоны).

$$N_2 + 8H + + 8e^- + 16АТФ \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16АДФ + 16P_i$$

Согласно данному уравнению, на одну молекулу фиксированного азота нитрогеназа выделяет одну молекулу водорода, при этом для этого ей требуется 8 электронов и 16 молекул АТФ. В отсутствии молекулярного азота все электроны направляются нитрогеназой на выделение водорода, что и определяет ее важную роль в выделении водорода цианобактериями. Выработка водорода, катализируемая нитрогеназой, происходит со скоростью от одной трети до одной четвертой от скорости фиксации азота. Высокая чувствительность нитрогеназы к действию кислорода, нейтрализуется рядом защитных механизмов, таких как пространственное разделение (в гетероцистах) и временное разграничение процессов азотфиксации и фотосинтеза. Описанию структуры, регуляции синтеза и механизма действия нитрогеназы посвящено немало научных работ [5-24].

В зависимости от содержания металла в активном центре фермента обнаружены три типа нитрогеназ:

1. Мо-нитрогеназа (Мо);

2. V-нитрогеназа (V);

3. Fe-нитрогеназа (Fe).

Найболее изученна Mo-нитрогеназа (рисунок 2). Динитрогеназа представляет собой гетеротетрамер a2b2, имеющий молекулярную массу около 220-240 кДа соответственно, расщепляет атомы азота. Динитрогеназа редуктаза является гомодимером около 60-70 кДа и играет роль, посредника при переносе электронов от внешнего донора электронов (ферредоксин или флаводоксин) к динитрогеназе. Mo-нитрогеназа синтезируется как в гетероцистах так и в вегетативных клетках [26]. Сообщается, что *Anabaena variabilis* ATCC 29413 имеет одну Mo-нитрогеназу, которая образуется в кислородных условиях роста в гетероцистах и вторую Mo-нитрогеназу, которая образуется только в бескислородных условиях в вегетативных клетках. Синтез нитрогеназы контролируется активностью фермента, которая регулируется метаболически уровнем АТФ/АДФ в клетках и зависит от величины эндогенного пула восстановителя [27-30].

Кроме Mo-нитрогеназы у цианобактерий обнаружены нитрогеназы, содержащие в своем активном центре ванадий и железо, синтез которых репрессирован в присутствии в среде Mo [28].

V-нитрогеназа цианобактерий впервые описана у *A. variabilis* [29], клетки которой в условиях дефицита молибдена и в присутствии ванадия в среде, восстанавливая ацетилен до этилена, выделяли большее количество водорода. Среди цианобактерий, V-нитрогеназа найдена в изолятах *Anabaena* CH1 и *Anabaena* azotica [30], в одном штамме *Nostoc* и двух штаммах *Anabaena* [31]. Однако структурные гены ванадиевой нитрогеназы найдены и описаны у *A.* variabilis, *Nostoc* punctiforme [30]. V-Fe-белок V-нитрогеназы являясь гетерогексомером содержит дополнительно еще 2 δ-субъединицы.

Сведений о типе нитрогеназы, не содержащей в своем активном центре ни Mo, ни V, так называемой Fe-нитрогеназе в литературе очень мало. В основном она обнаружена у некоторых видов азотобактера и пурпурных бактерий. Среди цианобактерий она обнаружена лишь в клетках *A.* variabilis. При

этом известно, что скорость выделения водорода клетками с Fe-нитрогеназой ниже, чем с молибденовой или ванадиевой нитрогеназами [25].

*Гидрогеназы*.

Второй группой ферментов участвующих в метаболизме водорода являются гидрогеназы. Это гетерогенная группа ферментов характеризуется большим разнообразием структуры, свойств и выполняемых функций. Фермент катализирует простейшую химическую реакцию, обратимое восстановление образования водорода из протонов и электронов:

$$2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$$

Все ныне известные гидрогеназы относятся к трем классам, выделяемым на основании строения активного центра [30]:

NiFe-гидрогеназы (железоникелевые гидрогеназы);

FeFe-гидрогеназы (железосодержащие гидрогеназы);

Fe-гидрогеназы («неметаллические» гидрогеназы).

Гидрогеназы, существующие у большинства фотосинтетических микроорганизмов, в том числе и у цианобактерий, классифицированы на 2 группы: 1) поглощающие гидрогеназы (Hup), катализируют потребление водорода, продуцируемого нитрогеназой и 2) обратимые гидрогеназы (Hox), которые обладают способностью как поглощать, так и производить водород [31].

Двунаправленная Hox-гидрогеназа относится к железоникелевым гидрогеназам и состоит из комплекса, включающего HoxE, HoxF, HoxU, HoxY и HoxH белки. В комплексе HoxYH, HoxH содержит каталитический центр, который катализирует окисление водорода (Рисунок 2). HoxY содержит кластер Fe4S4, который облегчает перенос электронов в каталитический центр и из него. Электроны, высвобождаются активным центром в потоке HoxH через малую субъединицу HoxY, и через железосерные кластеры HoxEFU (32). Эта гидрогеназа напрямую взаимодействует с НАД(Ф), восстанавливая его в присутствии водорода или выделяя водород в присутствии восстановленных пиридиннуклеотидов. Hox-гидрогеназа обнаружена у большинства цианобактерий, не

зависимо от их морфологии и способности к азотфиксации. В литературе приводятся сведения об обнаружении фермента как у одноклеточной цианобактерии *Synechocystis*, так и в клетках нитчатой *Anabaena.* Так они подробно описаны для *Anabaena variabilis, Anabaena* PCC 7120, *Synechococcus* PCC6301 и *Synechocystis* PCC 6803 [33-36]. Но необходимо отметить высокую чувствительность фермента к кислороду и необходимость для ее функционирования микроаэробных либо анаэробных условий, о чем свидетельствует отсутствие Hox-гидрогеназы в клетках морских штаммов цианобактерий, выделенных с поверхности океана [37].

Поглощающая гидрогеназа HupSL, состоит из двух субъединиц, большой субъединицы HupL и малой субъединицы HupS (приблизительно 60 кДа и 30 кДа соответственно. Большая субъединица содержит активный центр и характеризуется биметаллическим NiFe центром, в то время как малая субъединица содержит железосерные кластеры, которые обеспечивают перенос электронов от активного центра на акцептор электронов. Фермент HupSL обнаруживающийся в клетках азотфиксирующих цианобактерий, экспрессируется в условиях азотного голодания и тесно связан с нитрогеназной активностью [38-40]. HupSL гидрогеназа синтезируется гетероцистами для того, чтобы поглощать водород, как экзогенный, так и выделяемый нитрогеназой. В присутствии азота гетероцистные цианобактерии не выделяют водород на воздухе даже в азотфиксирующих условиях. Показано наличие поглощающих гидрогеназ в тесной связи с нитрогеназами в клетках *Nostoc punctiforme*. Определено, что у *A. variabilis* AECC29413 водородпоглощающая гидрогеназа учавствует в поглощении водорода, сопряженном с поглощением кислорода [41]. Такая реакция в гетероцистах способствует снижению уровня парциального давления кислорода, который токсичен для нитрогеназы, а также может дополнительно снабжать нитрогеназу электронами [42]. Так, например, в *Anabaena variabilis* hupSL транскрибируется в условиях истощения азота посредством действия глобального цианобактериального регулятора азота *Ntc*A [43]. В некоторых случаях максимальная

индукция экспрессии *hup*SL наблюдается в присутствии водорода [43].

Поскольку представители цианобактерий обладают разными нитрогеназами и гидрогеназами, пути метаболизма, приводящие к продуцированию водорода у разных видов различны. Выделение водорода гетероцистными цианобактериями за счет действия нитрогеназы считается наиболее перспективным, поскольку несмотря на высокую чувствительность нитрогеназы к кислороду, у них существует ряд механизмов, обеспечивающих защиту фермента от повреждения кислородом. Гетероцисты, представляющие собой микробную клетку цианобактерий, обеспечивающую квазианаэробную микросреду для чувствительной к кислороду нитрогеназе, не экспрессируют активную фотосистему 2, поэтому не выделяют кислород при расщеплении воды (Рис. 3).

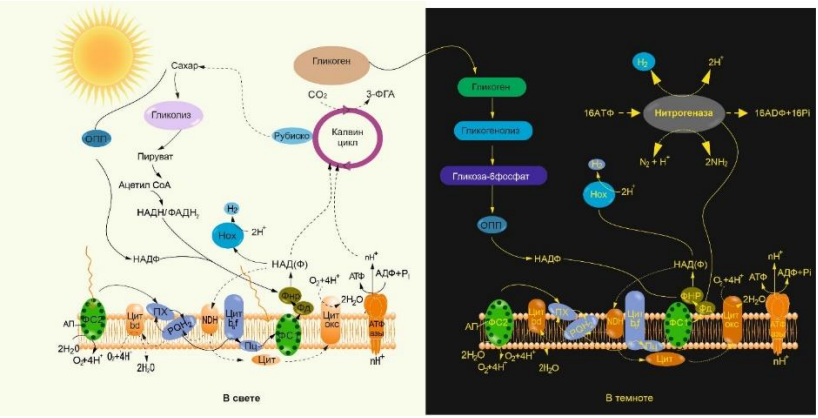



Рис. 3. Схема метаболических путей кислорода и водорода у негетероцистных цианобактерий при освещении и в темноте

Цит, хинолоксидаза; Цит $b_6f$, цитохром b6f; Цит $c_{553}$, цитохром $c_{553}$; Цит$_{ox}$, цитохром с оксидаза; Фд, ферредоксин; ФНР, ферредоксин-НАДФ редуктаза; Нох, двунаправленная Нох-гидрогеназа; Hup, поглощающая гидрогеназа; $N_2$аза, нитрогеназа; NDH-I, НАДФН-дегидрогеназа (комплекс I); ОПП,

окислительный пентозофосфатный путь; ПК, пластоцианин; PS, фотосистема; ПЦ: пластохиноновый пул; Рубиско, оксигеназа рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы;

СДГ: сукцинатдегидрогеназа. Изменено из литературы [43].

Помимо этого, они обладают очень активной дыхательной системой, которая, будучи связанной с мембраной, может потреблять незначительное количество поступающего кислорода, прежде чем он достигнет нитрогеназы в цитоплазме. Непрямой биофотолиз является еще одной стратегией, которая может быть использована для производства водорода цианобактериями. В этом процессе фотосинтез с выделением кислорода используется на одной стадии для фиксации и накопления углерода, в результате чего образуются восстановленные соединения углерода, которые впоследствии могут быть использованы на второй, анаэробной, производящей водород стадии. Таким образом, чувствительная к кислороду реакция восстановления протонов отделена во времени и пространстве от фотосинтеза, продуцирующего кислород.

Тем не менее, большая часть выделения водорода, наблюдаемого у гетероцистных цианобактерий, обусловлена ферментом нитрогеназой, которая, как обсуждалось выше, продолжает в отсутствие других восстанавливаемых субстратов, восстанавливать протоны до водорода в относительно медленной реакции, которая также требует значительных затрат энергии ($2АТФ/e^-$; $4АТФ/H_2$).

Известно, что энергетически эффективным процессом получения биоводорода является получение водорода на основе цианобактерий, которые не содержат гетероцист, поскольку эти процессы не сопровождаются потреблением огромного количества энергии (Рисунок 3). Существует ряд известных реакций получения водорода цианобактериями, которые потенциально могут быть использованы при практическом крупномасштабном производстве водорода. Так, известно, что у некоторых одноклеточных и нитчатых цианобактерий, таких, как *Synechocystis* sp.strain RF-1, *Synechococcus* sp strain Miami BG43511, *Gloethece* sp. stran Atcc51142, *Oscillatoria* sp., *Plectonema* sp. нитрогеназа активна при выращивании в чередующемся режиме свет-темнота, где процессы фотосинтеза

и дыхания находятся под циркадным контролем [44-45]. Циркадный ритм проявлясь в том, что максимальные активности азотфиксации и дыхания и фотосинтеза повторяются с циклическим интервалом, предотвращая кислородное ингибирование нитрогеназы. Способностью к выделению темнового водорода, катализируемого либо нитрогеназой, либо гидрогеназой в основном обладает ряд микроводорослей [45-46]. Тем не менее, сообщается, что одноклеточная цианобактерия *Cyanothece* [48] способна к образованию водорода под действием света из-за действия нитрогеназы, однако этому способствовали определенные условия культивирования, такие как низкая интенсивность света, наличие глицерина и аргона. Описаны случаи выделения водорода клетками цианобактерий, обладающими растворимой NADH-связанной [NiFe]-гидрогеназой, при освещении после наступления темноты [49-50]. Предполагается, что при возобновлении фотосинтеза на свету, клетка возвращается в надлежащий окислительно-восстановительный статус. Однако такая активность быстро ингибируется с возобновлением выделения кислорода.

Важно проверить приведенную выше теоретическую информацию в лаборатории. Для этого необходимо провести сортировку фототрофных микроорганизмов, выделенных из разных экосистем. Согласно этому скринингу важно использовать активные виды, активно выделяющие водород, в дальнейшем производстве $H_2$.

В связи с этим провели исследование, целью которого было выявить новые штаммы цианобактерий, которые активно продуцируют $H_2$, и оптимизировать условия культивирования для повышения эффективности светозависимого продуцирования $H_2$. В данной статье представлены результаты отбора, идентификации и возможности производства четырех штаммов цианобактерий $H_2$ (в темноте и на свету) и эффекты ингибитора фотосинтеза 3- (3,4-дихлорфенил) -1,1-диметилмочевины (DCMU) по фотопродукции $H_2$ цианобактериями на свету.

Так же представлены результаты исследования выделения водорода исследуемыми штаммами цианобактерий, не

обладающими способностью фиксировать молекулярный азот, поскольку как известно, применение синезеленых водорослей, которые не содержат гетероцисты и используют для выделения водорода только гидрогеназу без потребления огромного количества энергии, как в случае азотфиксирующих культур, более перспективно.

Все штаммы выращивали в идентичных анаэробных условиях, при освещении 30 мкмоль фотоны $м^2$/сек при непрерывном барботировании воздухом. Биомассу собирали центрифугированием и суспендировали в среде, не содержащей азот, изначальная оптическая плотность суспензии для каждой культуры составила – 1,5 при 730 нм. Затем для определения выделения водорода 7,5 мл клеточной суспензии переносили в 24 мл флаконы с ГХ и газовую фазу флаконов заменяли на аргон. Флаконы инкубировали в течение 166 ч при температуре 30ºС в темноте.

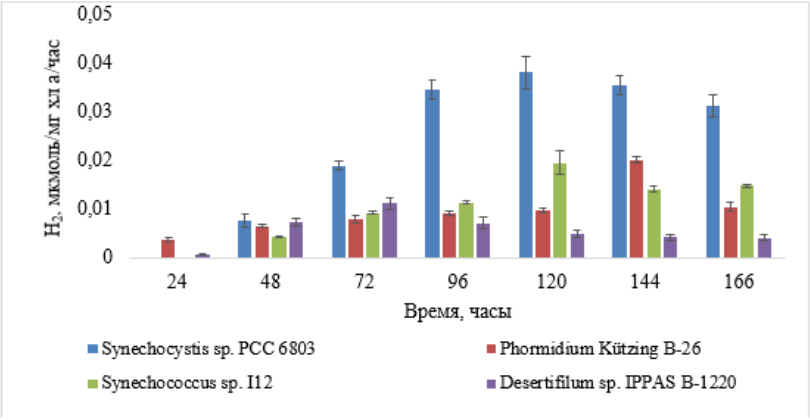



Рис. 4. Выделение водорода исследуемыми штаммами цианобактерий в анаэробных условиях в темноте

Согласно полученным результатам выделение водорода в темноте наблюдалось у всех исследованных культур. Наибольшей была продуктивность водорода у контрольного штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803, клетки которого начали выделять водород через 48 ч после дегазации в темноте. Выход

$H_2$ к этому времени составил 174 мл $H_2$/мг хл. Максимальное накопление водорода данной культурой отмечено через 120 ч инкубации, которое при этом составило 0,87 мл $H_2$/мг хл, в последующие часы эксперимента наблюдается медленное снижение выделения водорода, что естественно связано с полным потреблением имеющихся в среде питательных субстратов.

Исследуемые опытные штаммы обладали меньшей водород продуцирующей активностью в темноте по сравнению с контрольным штаммом. Из опытных штаммов наиболее высокий уровень продукции $H_2$ наблюдался у штаммов *Phormidium* Kützing B-26 и *Synechococcus* sp. I12. Эти два штамма характеризовались более близким значением выхода водорода и отличались между собой по времени максимального накопления водорода. Так, накопление $H_2$ клетками *Phormidium* Kützing B-26 через 24 часа составило 0,086 мл $H_2$/мг хл, и через 144 часа наблюдалось максимальное продуцирование $H_2$ равное 0,462 мл $H_2$/мг хл. Максимальное выделение водорода штаммом *Synechococcus* sp. I12 отмечено через 120 ч инкубирования, данный показатель к этому времени составил 0,448 мл $H_2$/мг хл. Среди исследованных штаммов цианобактерий, более низкая способность выделять водород в темноте выявлена у штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, его максимальная водородная продуктивность составила 0,255 мл $H_2$/мг хл, однако необходимо отметить что данное значение наблюдается уже через 72 часа инкубации, после чего далее наблюдается постепенное снижение выделение водорода (Рисунок 4).

Следующая часть работы посвящена изучению накопления водорода исследуемыми штаммами цианобактерий в условиях освещения, поскольку как известно, световая энергия важна для выделения водорода и действует как донор электронов для прямого биофотолиза [14]. Прямой биофотолиз цианобактериями является широко используемым методом расщепления воды на $H^+$ и $O_2$ с использованием света в качестве источника энергии. Когда энергия света поглощается клетками цианобактерий, она усиливает окисление молекул $H_2O$ в ФС2, а высвобождаемые протоны и электроны транспортируются в хлоропласт-ферредоксин через ФС1. Фд играет роль электрона

для [FeFe]-гидрогеназ, что способствует восстановлению $H^+$ до молекул $H_2$.

В этом эксперименте исследуемые виды цианобактерий культивировали аналогично предыдущему эксперименту, условия инкубации клеток при изучении водородной продуктивности были те же и отличались только наличием освещения. Изначальная оптическая плотность суспензии для каждой культуры составила – 1,5 при 730 нм. Выделение водорода штаммами цианобактерий наблюдали при их инкубации в атмосфере Аргон в течение 190 ч при освещенности 30 мкмоль фотоны/м$^2$/сек.

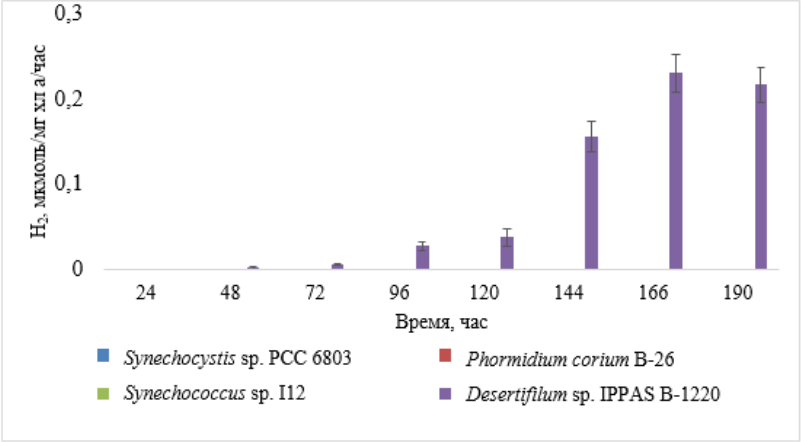



Рис. 5. Выделение водорода ($H_2$) исследуемыми штаммами цианобактерий в анаэробных условиях при освещении

В результате проведенных экспериментов было установлено что, наиболее активным продуцентом водорода на свету оказался штамм *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220. Выработка водорода клетками *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 наблюдается на второй день после установления анаэробных световых условий, что в свою очередь подтверждает тот факт, что гидрогеназа активируется при переносе в бескислородную среду. Активное выделение водорода сохраняется в течение семи дней, а затем начинает уменьшаться (Рис. 5). Самые

высокие показатели накопления водорода было отмечено через 166 часов, который составил 5,257 мкл $H_2$/мг хл.

Необходимо отметить, что при этом скрининге в условиях освещения остальные три штамма, в том числе и контрольный штамм, продемонстрировавшие относительно высокие показатели накопления водорода в предварительном темновом эксперименте (рис. 5), в данном случае не проявляли водород продуцирующую активность.

Установлено, что штамм *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 при освещении выделяет водород более чем в 20 раз больше чем в темноте, и в 6 раз больше водорода продуцирует по сравнению с контрольным штаммом *Synechocystis* sp. PCC 6803. Таким образом среди исследованных штаммов этот объект по способности продуцировать водород на свету является приоритетным.

Известно, что водородное топливо может использоваться в различных типах топливных элементов в качестве экологически чистой энергии для производства электроэнергии с высокой эффективностью. Цианобактерии могут быть использованы в качестве потенциального источника энергии водорода за счет их способности расщеплять воду на водород и кислород с помощью солнечной энергии [50]. Более того, это производство молекулярного водорода считается более эффективным и менее энергоемким. Однако в настоящее время энергия водорода из цианобактерий менее экономически целесообразна из-за высокой стоимости. В связи с этим эффективное производство биоводорода из цианобактерий может быть ускорено благодаря последним технологическим достижениям с использованием методов метаболической и генной инженерии [51], а также использованием штаммов, характеризующихся высокой водородпродуцирующейся способностью.

В данной статье представлены результаты исследования выделения водорода различными штаммами цианобактерий, не обладающими способностью фиксировать молекулярный азот. С целью поиска перспективного продуцента водорода были исследованы 3 штамма цианобактерий *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. I12, *Phormidium* Kützing B-26. Штамм цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 был взят для

исследований в качестве положительного контроля, как штамм активно продуцирующий водород.

Изучено накопление водорода исследуемыми штаммами цианобактерий в темноте и в условиях освещения. Хорошо известно, что световые условия чрезвычайно важны для роста и продуктивности фотосинтезирующих организмов. В экспериментах по фотообразованию водорода клетками цианобактерий световые условия принципиально важны для двух процессов: 1) переноса электрона из фотосинтетической ЭТЦ (центры электронного транспорта) на гидрогеназу, и 2) выделения кислорода в ФС2, которое влияет на гидрогеназную активность и скорость фотоингибирования. Ранее было показано, что штамм *Oscillatoria limosa* strain 23 выделенный из океана производил водород путем прямого биофотолиза [52], штамм *Phormidium valderianum* BDU 20041 синтезировал большое количество водорода в результате прямого и не прямого биофотолиза на протяжении несколько часов [53]. Не гетероцистный штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 по данным Burrows и другие в процессе непрямого биофотолиза активно продуцировал водород, при этом отмечено, что максимальная скорость производства водорода достигала 18,4 мкл $H_2$/мг хл.

Согласно полученным данным, из всех исследованных штаммов цианобактерий наибольшую продуктивность по водороду проявили два штамма: штамм дикого типа *Synechocystis* sp. PCC 6803, взятый в качестве положительного контроля, характеризующийся как штамм активно продуцирующий водород активно накапливал водород в анаэробных условиях в темноте и опытный штамм дикого типа *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 активно продуцировал молекулярный водород на свету в анаэробных условиях. Из рисунков 2 – 3 видно, что высокий выход водорода как в темноте так и на свету обусловлен высокой скоростью образования водорода клетками цианобактерий через 120 – 166 часов инкубации, после чего выделение водорода прекращалось. При этом необходимо отметить что накопление водорода клетками штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 в условиях освещения было значительно выше по сравнению с контрольным штаммом *Synechocystis* sp. PCC 6803, активно

продуцирующим водород в темноте. Хочется отметить тот факт, что штаммы вида *Desertifilum* ранее не были изучены по продуктивности молекулярного водорода. Этот вид является близким к виду *Oscillatoria*.

### 2.2. Возможные пути увеличения выделения водорода клетками цианобактерий

Несмотря на то, что в настоящее время механизмы основных процессов продукции водорода клетками фототрофных микроорганизмов хорошо изучены, биологическое производство водорода далеко от внедрения в практику. Основными ограничениями для устойчивого выделения водорода являются кислородная чувствительность ферментов, конкуренция за электроны между различными путями, использующими восстановленные электроны. Дополнительные осложнения связаны с тем, что процесс выделения водорода является нестабильным. Поэтому выделение водорода цианобактериями наблюдается пока что только в лабораторных условиях. Для коммерческой осуществимости необходимо повысить скорость выделения водорода и длительность этого процесса [51].

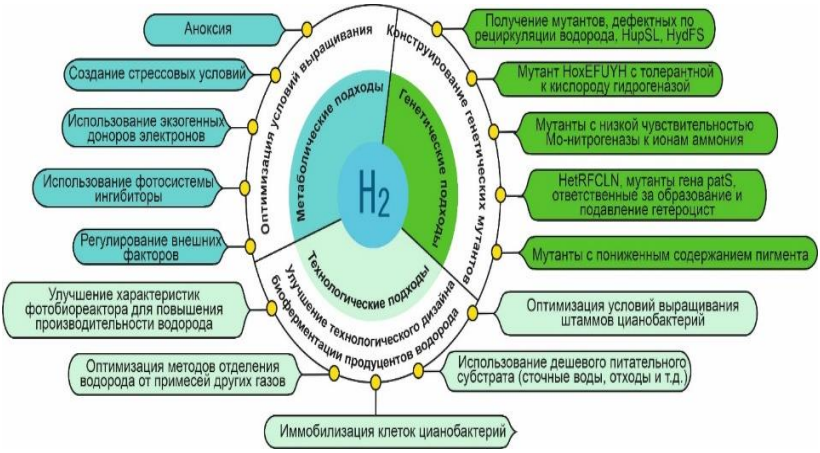



Рис. 6. Основные подходы увеличения продукции водорода клетками цианобактерий

В настоящее время изучаются много различных подходов для улучшения производства водорода цианобактериями. Все эти подходы в целом сводятся к трем основных пунктам: метаболические, генетические и технологические подходы увеличения продукции водорода (Рисунок 6) [51-52].

### 2.3. Метаболические подходы увеличения выхода водорода клетками цианобактерий

Метаболические подходы в увеличении продукции биоводорода связаны с разработкой физиологических и биохимических подходов, позволяющих повышать скорость и продолжительность продуцирования $H_2$ цианобактериями.

Эффективность процесса выделения водорода клетками цианобактерий зависит от многих факторов, что особенно очень важно при его масштабном производстве. Кроме интенсивности освещения, температуры, pH среды, наиболее важными из них являются наличие молекулярного кислорода, соленость, состав питательной и газовой среды и т.д. При этом известно, что различные параметры по-разному влияют на процесс выделения водорода разными штаммами цианобактерий.

Влияние на водородпродуцирующую активность таких основных факторов, как состав газовой среды, освещенность, pH среды и температура детально освещены во многих обзорах [52]. Показатель pH является одним из факторов сильно влияющим на выработку водорода. Согласно последним исследованиям, оптимальное значение pH для продукции водорода было между 5 и 7. Этот показатель регулирует эффективность ферментативного механизма цианобактерий и играет огромную роль в окислительно-восстановительном потенциале клеток. Касаемо освещения, несмотря на существующую потребность цианобактериальных видов в освещении, и в способности этих культур к выделению водорода как на свету так и при его отсутствии, активное выделение водорода их клетками все же преймущественно наблюдается в темноте [53]. Так, отмечено, что оптимальными условиями для выделения водорода культурой *Spirulina platensis* были 32$^{o}$C, полный анаэробиоз и отсутствие освещения [53]. Выход водорода у *Synechococcus* Nag. PCC 7942 также

наблюдался в темноте в анаэробных условиях. Температура, подобно показателю pH играет важную роль в увеличении способности цианобактерий производить водород, контролируя обмен веществ посредством регулирования ферментативных реакций. Согласно литературным данным, существуют различия в оптимальных требованиях к температуре в зависимости от вида цианобактерий. Оптимальный диапазон для активной продукции биоводорода клетками цианобактерий колеблется в пределах 30-40°C.

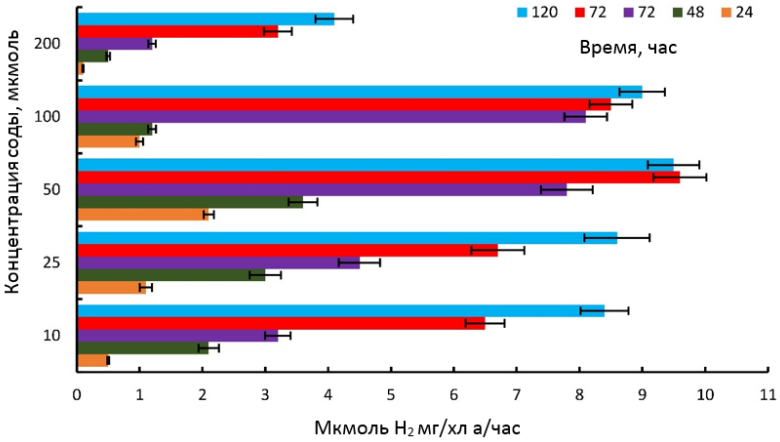



Рис. 7. Влияние концентрации $NaHCO_3$ на скорость продукции $H_2$ *Anabaena variabilis* A-1.

Клетки выращивали при освещении со скоростью 40 мкмоль фотонов $м^2/с$ и непрерывном барботировании воздухом. Клетки собирали центрифугированием и суспендировали в свежей среде до конечной концентрации $ОП_{720}$-1,5, клеточную суспензию переносили в 20 мл ГХ флаконы и газовую фазу флаконов заменяли на Ar. Флаконы инкубировали в течение 120 ч при 23°C в темноте. Концентрация $NaHCO_3$ для всех вариантов составляла 50 ммоль. Скорость образования $H_2$ определяли с помощью ГХ. Проверено однофакторным дисперсионным анализом с последующими множественными сравнениями, $p < 0,05$.

С целью изучения воздействия различных факторов окружающей среды было проведено исследование видов цианобактерий. Основной целью данного исследования является оптимизация продукции водорода штаммом *Anabaena variabilis* A-1. Для этого, все образцы культивировали при 25°C в культуре при альтернативном 12-часовом освещении белым флуоресцентным светом и 12-часовом цикле темноты для того чтобы получить хорошую биомассу. Очистив собранную биомассу от солей, создав анаэробную среду, к среде $BG_0$-11 добавляли $NaHCO_3$ в концентрациях 10, 25, 50, 100 и 200 мкмоль для анаэробного культивирования **(рис.7)**.

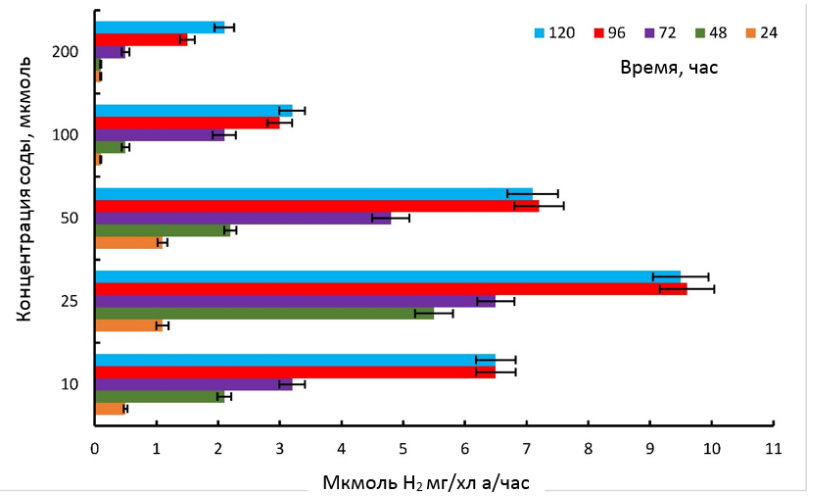



Рис. 8. Влияние концентрации HEPES на скорость продукции водорода штамма *Anabaena variabilis* A-2. Клетки выращивали при освещении со скоростью 40 мкмоль фотонов/м$^2$/с и непрерывном барботировании воздухом. Клетки собирали центрифугированием и суспендировали в свежей среде до конечной концентрации $ОП_{720}$-1,5, клеточную суспензию переносили в 20 мл ГХ флаконы и газовую фазу флаконов заменяли на Аргон. Флаконы инкубировали в течение 120 ч при 23°C в темноте. Концентрация HEPES для всех вариантов составляла 25 ммоль. Скорость образования $H_2$ определяли с помощью ГХ.

Во всех концентрациях, при различных концентрациях гидрокарбоната натрия в исследовательских работах отмечалось выделение водорода. Тем не менее, время выделения $H_2$ и объем выделенного водорода были разными. Снижение концентраций $NaHCO_3$ привело к увеличению общего объема выделения $H_2$, которое было в несколько раз выше, для 25 ммоль (9,6 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч) и 50 ммоль (7,2 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч) соответственно, чем в виалах высоких концентраций $NaHCO_3$. Эти результаты согласуются с работами [54], в которых был сделан вывод, что штамм *Anabaena variabilis* A-1, требующий гиперкарбоната, должен постоянно откачивать оптимальные уровни $Na^+$, который котранспортируется с бикарбонатом в качестве источника $CO_2$ для карбоксилирования и присутствует в оптимальных концентрациях в естественной среде обитания. Клетки делают это через «$Na^+$» требующий АТФ синтез. Биопродукция $H_2$ начинает снижаться после добавления 100 ммоль $NaHCO_3$ и достигла 3,2 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч, а при 200 ммоль $NaHCO_3$ это состовила всеволишь 2,1 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч, вероятно, из-за развития неблагоприятных условий: толерантность к высокой концентрации соли, содействие фиксации $CO_2$, что является причиной восстановительный путь $НАДН^+$ и эквивалентов $НАДФН^+$, которые являются предшественниками производства водорода [54].

Также, для характеристики физиологического ответа клеток *Anabaena variabilis* A-1 на осмотический стресс мы изучили рост культур, обработанных HEPES, и их влияние на выделение $H_2$. Влияние концентрации соли HEPES на выделившийся $H_2$ показано на **(рис.8).** Как видно из этого рисунка, концентрация HEPES сильно влияет на продукцию $H_2$. Водород, собранный во время солевого стресса, обратно пропорционален концентрации HEPES, введенной в ГХ виале. Увеличение концентрации HEPES с 100 ммоль до 200 мкмоль приводило к уменьшению выделения $H_2$ оптимальная концентрация для биоводорода составляла около ≥50 ммоль.

Стоит отметить, что после добавления HEPES выделение водорода во всех вариантах составило до 120 часов. Во всех вариантах выделение $H_2$ происходило при линейном подъеме, и максимальное выход было зарегистрировано при 50 мкмоль через

120 часов. Наименьший результат наблюдался при концентрации 200 мкмоль, выход которой составил 4,1 мкмоль $H_2$/мг хл/ч.

Также, Для дальнейшего анализа влияния pH на штамм *Anabaena variabilis* A-1 дикого типа, продуцирование H2 анализировали в экспериментах с виалами GC. Ожидается, что из-за прямого влияния доступности протонов на поток электронов и, следовательно, на производство водорода, pH будет играть решающую роль в производстве $H_2$. Таким образом, производство H2 измерялось при 7 различных уровнях pH: кислотном (pH = 5), нейтральном (pH = 7) и щелочном (pH = 9) для веса (рис.9).

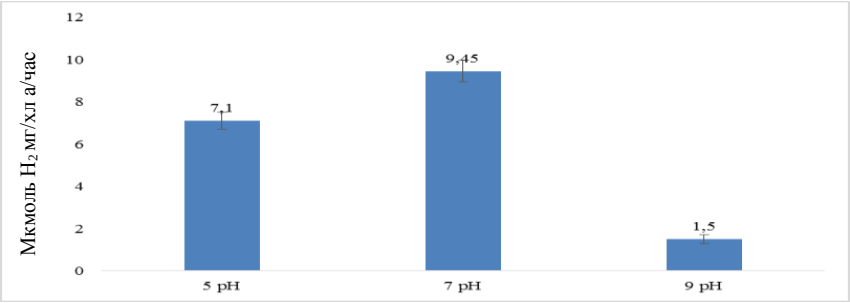



Рис. 9. Сравнение скорости продукции $H_2$ штаммом *Anabaena variabili*s A-1 в темноте. Клетки выращивали при освещении со скоростью 40 мкмоль фотонов м2/с и непрерывном барботировании воздухом. Клетки собирали центрифугированием и суспендировали в свежей среде до конечной концентрации $ОП_{720}$-1,5, клеточную суспензию переносили в 20 мл ГХ флаконы и газовую фазу флаконов заменяли на Аргон. Флаконы инкубировали в течение 120 ч при 23°C в темноте. Концентрации HEPES/$NaHCO_3$ для всех вариантов составляли 25/50 мкмоль. Скорость образования $H_2$ определяли с помощью ГХ.

Зависимость продукции $H_2$ N-ограниченными клетками от pH среды во время ферментации была различной при разных значениях pH (рис.9). Оптимальный pH для продукции $H_2$ клетками *Anabaena variabilis* A-1 составлял 7 (9,45 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч), перекрывая колебания в ростовой среде. Аналогичная зависимость продукции $H_2$ от pH была зарегистрирована и при

выращивании клеток на полных средах (данные не показаны). Следовательно, pH клеточной суспензии можно регулировать, чтобы оптимизировать продукцию $H_2$ одноклеточными недиазотрофными цианобактериями во время ферментации.

Кроме этого, особо хочется отметить влияние состава питательных сред, таких как источник углерода и макро и микроэлементы, необходимые для роста и влияющие на активность ферментов. Так, известно, что в присутствии простых органических соединений увеличивается выработка водорода, поскольку донирование электронов кофакторными соединениями повышает активность нитрогеназы [55]. Отмечено, что добавление различных сахаров стимулировало выработку водорода, к примеру использование маннозы, повысило скорость выхода водорода до 5,58 нмоль водорода на мг сухого веса в час [56].

Таблица 1. Оптимизация методов производства $H_2$

| Методика | Примечания | Количество | Штаммы | Скорость $H_2$, мкмоль $H_2$/мг хл/ч | Литература |
|---|---|---|---|---|---|
| Ингибирование фотосинтеза | DCMU | 50 мкмоль | *Anabaena cylindrica* | 30.8 | [43] |
| Лишенный серы | - | - | *Nostoc calcicola* | 4.27 | [57] |
| Микроэлементы | Ионы железа | 5 мг/л | *Anabaena cylindrica* | 110 | [58] |
| Иммобилизация | Альгинат | 3% | *Synechocystis* sp. PCC 6803 | 40.6 | [59] |
| Внешние факторы | pH | 7.5 | *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 | 140 | [60] |
| | Свет | 30 мкмоль /м$^2$/s | *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 | 300 | [48] |
| | Температура | 23$^o$C | *Nostoc* sp. PCC 7422 | 100 | [61] |
| Аноксия | Аргон | 100% | *Anabaena* | 320 | [62] |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | *cylindrica* B-629 | | |
| Источник восстановителя | Манноза | 10 ммоль | *A. variabilis* SPU 003 | 5.6 | [63] |
| | Глюкоза | 10 ммоль | *Anabaena cylindrica* UTEX B629 | 49.3 | [64] |
| | Фруктоза | 0.5% | *Anabaena siamensis* TISTR 8012 | 31.8 | [12] |
| | Фруктоза | - | *Cyanothece* sp. ATCC 51142 | 465 | [65] |

По поводу влияния различных микроэлементов на продукцию биоводорода клетками фототрофных микроорганизмов имеющиеся в литературе сведения противоречивы. Известно, что включение в питательные среды различных микроэлементов, таких как Fe, Cu, Co, Mo, Zn и Ni, заметно увеличивает выработку водорода из-за их участия в составе ферментов. Так Min и Sherman определили, что увеличение концентрации железа в среде в 10 раз, в виде цитрата железного аммония, было благоприятно для продукции водорода клетками штамма *Cyanothece* sp. ATCC 51142 [48]. Имеются сведения о том, что добавление в среду никеля обеспечивает нормальное накопление биомассы цианобактерии Arthrospira и значительного увеличения скорости производства водорода. Однако при этом, имеются сведения и об отрицательном влиянии низкой концентрации $Ni_2^+$ на выработку $H_2$ клетками азотфиксирующих штаммов *Anabaena* spp. CA и *Anabaena* spp. 1F. Сообщается, что низкая концентрация $Ni_2^+$ 10 нМ стимулировала поглощающую активность гидрогеназы и тем самым блокировала выработку $H_2$. Согласно полученным им данным, никель необходим для синтеза и активации водород поглощающей гидрогеназы [66].

Так существует несомненно много различных факторов влияющих на выход водорода в клетках цианобактерий, регулируя и изменяя их можно добиться больших результатов.

Несомненно, био поиск штаммов цианобактерий, характеризующихся способностью к продукции водорода в большем количестве играет важную роль в решении и реализации данного вопроса. Производство водорода было

изучено в очень широком разнообразии видов и штаммов цианобактерий. Эффективность продукции водорода зависит от метаболического потенциала микроорганизмов, который в свою очередь зависит от вида цианобактерий. На сегодняшний день известно, более 14 родов цианобактерий продуцирующих водород в различных условиях культивирования. В таблицу 1 сведены основные виды цианобактерий, характеризующиеся способностью активно продуцировать водород.

Таблица 2. Скорость выделения водорода штаммов цианобактерий

| **Штамм** | **Характеристики штамма** | **Максимальный выход H2** | **Литература** |
|---|---|---|---|
| Anabaena azollae | Гетероциста нитевидная | 38.5 ммоль $H_2$/мг хл/час | [67] |
| *Anabaena* cylindrica B-629 | Гетероциста нитевидная | 0.103 ммоль $H_2$/мг биомасса/час | [68] |
| *Anabaena* cylindrica IAMM-1 | Гетероциста нитевидная | 2.1 ммоль l $H_2$/мг хл/час | [69] |
| *Anabaena* cylindrica IAMM-58 | Гетероциста нитевидная | 4.2 ммоль $H_2$/mg хл/час | |
| *Anabaena* cylindrical UTEX B-629 | Гетероциста нитевидная | 0.91 ммоль $H_2$/мг хл/час | |
| *Anabaena* flos-aquae UTEX 1444 | Гетероциста нитевидная | 1.7 ммоль $H_2$/мг хл/час | |
| *Anabaena* flos-aquae UTEX LB 2558 | Гетероциста нитевидная | 3.2 ммоль $H_2$/мг хл/h | |
| *Anabaena* sp. PCC 7120 | Гетероциста нитевидная | 2.6 ммоль $H_2$/мг хл/час | |
| *Anabaena* variabilis 1403/4B | Гетероциста нитевидная | 20 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [70] |
| *Anabaena* variabilis ATCC 29413 | Гетероциста нитевидная | 45.16 ммоль $H_2$/мг хл/час | [67] |
| *Anabaena* variabilis ATCC 29413 | Гетероциста нитевидная | 0.05 ммоль $H_2$/мг биомасса/час | [70] |
| *Anabaena* variabilis | Гетероциста | 39.4 ммоль | [71 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ATCC 29413 | нитевидная | $H_2$/мг хл/час | |
| *Anabaena* variabilis AVM13 | Гетероциста нитевидная | 68 ммоль $H_2$/мг хл/час | [39] |
| *Anabaena* variabilis PK17R | Гетероциста нитевидная | 59.18 ммоль $H_2$/мг хл/час | [67] |
| *Anabaena* variabilis PK84 | Гетероциста нитевидная | 32.3 ммоль $H_2$/мг хл/час | [39] |
| *Anabaena* variabilis PK84 | Гетероциста нитевидная | 167.6 ммоль $H_2$/мг хл/час | [67] |
| *Anabaena* variabilis PK84 | Гетероциста нитевидная | 0.11 ммоль $H_2$/мг хл/час | [72] |
| *Anabaena* variabilis SPU 003 | Гетероциста нитевидная | 5.58 нмоль $H_2$/мг биомасса/час | [73] |
| *Anabaenopsis* circularis IAM M-13 | Гетероциста нитевидная | 0.31 ммоль $H_2$/мг хл/час | [69] |
| *Anabaena siamensis* TISTR 8012 | Гетероциста нитевидная Δ *hup*S | 2.426 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [74] |
| *Aphanocapsa montana* | Одноклеточные, не азот фиксирующие | 0.40 мкмоль $H_2$/mg chl/h | [73] |
| *Aphanothece halophytica* | Одноклеточные, не азот фиксирующие | 82.79 нмоль $H_2$/мг биомасса/час | [74] |
| *Calothrix membrnacea* B-379 | Гетероциста нитевидная | 0.108 ммоль $H_2$/мг биомасса/час | [68] |
| *Calothrix scopulorum* 1410/5 | Гетероциста нитевидная | 0.128 ммоль $H_2$/мг биомасса/час | |
| *Chroococcidiopsis thermalis* CALU 758 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.7 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [75] |
| *Cyanothece* 7822 | Неазотфиксирующие одноклеточные, диазотрофные | 0.92 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | [76] |
| *Cyanothece* 51142 | Неазотфиксирующие одноклеточные, диазотрофные | 465 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | [77] |
| *Desertifilum* sp. | Азотфиксирующие, | 0.348 мкмоль | [78] |

| | | | |
|---|---|---|---|
| IPPAS B-1220 | нитевидные | $H_2$/мг хл/ч | |
| *Gloebacter* PCC 7421 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 1.38 ммоль $H_2$/мг хл/ч | [75] |
| *Gloeocapsa* alpicola CALU 743 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.58 мкмоль $H_2$/мг прот | [79] |
| *Microcoleus* chthonoplasts | Нитевидный, не фиксирующий азот | 1.7 нмоль $H_2$/мг прот/ч | [80] |
| *Microcystis* PCC 7820 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.16 ммоль $H_2$/мг хл/ч | |
| *Mycrocystis* PCC 7806 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 11.3 нмоль $H_2$/мг прот/ч | [69] |
| *Nostoc commune* IAM M-13 | Гетероциста нитевидная | 0.25 ммоль $H_2$/мг хл/ч | [69] |
| *Nostoc linckia* IAM M-30 | Гетероциста нитевидная | 0.17 ммоль $H_2$/мг хл/ч | |
| *Nostoc muscorum* IAM M-14 | Гетероциста нитевидная | 0.60 ммоль $H_2$/мг хл/ч | |
| *Oscillatoria* brevis B-1567 | Нитевидный, не фиксирующий азот | 0.168 ммоль $H_2$/мг сухая масса/h | [68] |
| *Oscillatoria* limosa strain 23 | Нитевидный, не фиксирующий азот | 19.83 мл $H_2$/мг хл/ч | [81] |
| *Oscillatoria* sp. Miami BG7 | Нитевидный, не фиксирующий азот | 5.9 мл $H_2$/ мг сухая масса/ч | [82] |
| *Oscillatoria* sp. Miami BG7 | Нитевидный, не фиксирующий азот | 260 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | [83] |
| *Phormidium valderianum* BDU 20041 | Нитевидный, не фиксирующий азот | 0.2 мл $H_2$/мг сухая масса /ч | [84] |
| *Phormidium valderianum* BDU 20041 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.22 мл $H_2$/мг сухая масса /ч | [64] |
| *Spirulina platensis* | Одноклеточные, | 1.02 мкмоль | [85] |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | не фиксирующие азот | $H_2$/мг сухая масса/ч | |
| *Spirulina* strain | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 1.22 ммоль $H_2/м^3$/ч | [86] |
| *Synechoccus* PCC 6301 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.09 ммоль $H_2$/мг хл/ч | [83] |
| *Synechococcus* PCC 602 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.66 ммоль $H_2$/мг хл/ч | [85] |
| *Synechococcus* PCC 6830 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.26 ммоль $H_2$/мг хл/ч | |
| *Synechococcus* PCC 6307 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.02 ммоль /мг хл/ч | |
| *Synechococcus* PCC 6830 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.12 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | [83] |
| *Synechococcus* PCC7942 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 162.52 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | [37] |
| *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 140 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | [38] |
| *Synechocystis* PCC 6308 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.13 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | [85] |
| *Synechocystis* PCC 6714 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.40 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | |
| *Synechocystis* PCC 6308 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.07 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | [73] |
| *Synechocystis* PCC 6714 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 0.075 мкмоль $H_2$/мг хл/ч | |
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 190 нмоль $H_2$/мг хл/мин | [87] |

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 115 нмоль $H_2$/мг хл/мин | [88] |
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 300 нмоль $H_2$/мг хл/ч | [89] |
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 18.4 мл $H_2$/мг хл/ч | |
| *Synechocystis* strain M55 | Одноклеточные, не фиксирующие азот | 200 нмоль $H_2$/мг хл/мин | [90] |

Среди них хочется отметить некоторые виды. Так одноклеточные нефиксирующие азот цианобактерии *Gloeocapsa alpicola* в условиях серного голодания демонстрируют повышенную выработку водорода [79]. Сообщается, что *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) может вырабатывать водород (1 мкмоль/мг/сухого веса клеток/ч) в анаэробных условиях в темноте [85]. Хорошо изучены в отношении водородпродуцирующей активности азотфисирующие виды цианобактерии рода Anabaena. Так, *Anabaena cylindrica*, вырабатывает водород и кислород одновременно в атмосфере аргона в течение 30 дней в условиях ограниченного освещения [91]. *Anabaena* sp. способна производить значительное количество водорода, *Anabaena cylindrica*, в условиях недостатка азота, вырабатывает наибольшее количество водорода (30 мл/литр культуры/час) и т.д. Также одним из наиболее многообещающих азотфиксирующих цианобактерий является *Cyanothece* 51142 [92]. Доступна полная ее метаболическая модель для оценки общей теоретической способности этого организма в производстве водорода. Данный штамм может продуцировать водород со скоростью до 465 мкмоль/(мг хлорофилла × ч) в присутствии глицерина в ~~виде~~ качестве источника углерода [77].

Имеются сведения о продукции водорода галотолерантными цианобактериями, из них *Aphanothece* halophytica демонстрирует хороший потенциал [74].

Известно, что молекулярный кислород является ингибитором активности ферментов гидрогеназы и нитрогенезы [6]. Поэтому удаление из среды $O_2$, образующегося в качестве побочного продукта окисления $H_2O$ в ФС2 и является необходимым для экспрессии генов, ответственных за светозависимое выделение водорода. Так, основные процессы метаболических подходов увеличения продуктивности цианобактерий по выделению водорода направлены на ингибирование ФС2, с целью создания бескислородных условий и таким образом увеличения нитрогеназной активности.

С этой целью, активно проводят продувку культуральной среды инертными газами, которые удаляют кислород из суспензии. Так значительно более длительное образование водорода цианобактериями *Azollae* и *Anabaena variabilis* наблюдали в анаэробных условиях, при продувании среды аргоном [10]. Применение аргона, приводило к увеличению нитрогеназной активности и количеству гетероцист у цианобактерий [93]. Отмечено, что аэрирование биомассы в процессе роста культуры *A. variabilis* РК 84 смесью газов в соотношениях 73 % аргона, 25 % $N_2$ и 2 % $CO_2$ и 93 % аргона, 5 % $N_2$ и 2 % $CO_2$, позволили достичь высокого выхода водорода – 167.6 мкмоль/мг хл/ч [71].

Кроме продувания инертных газов, следующим подходом в увеличения выработки водорода клетками цианобактерий является создание условий дифицитных по макроэлементам. Известно, что удаление из питательных сред необходимых макроэлементов таких как сера, азот и фосфор резко стимулируют выработку водорода клетками, связанное с изменениями их метаболизма.

Так, недостаток серы и азота, необходимых для образования таких соединений как аминокислоты, белки, витамины, тиамин, и др., замедляет рост и снижает жизнеспособность фотосинтезирующих организмов [94]. Влияние голодания по макроэлементам на выработку водорода цианобактериями изучено у нефиксирующих азот штаммов *G. Alpicola* CALU 734 и *Synechocystis* sp. PCC 6803 [79]. Азотное

голодание у *G. alpicola* CALU 734 повышает уровень гликогена почти на 40%. Аналогичная картина увеличения в клетках запасов гликогена описана для клеток *G. alpicola* CALU 734 и *Synechocystis* зр. PCC 6803 после удаления из среды серы. Согласно полученным им результатам, в условиях голодания по данным макроэлементам в клетках цианобактерий наблюдается значительное увеличение активности гидрогеназы, что привело к увеличению времени выделения водорода до 8 ч с максимальной скоростью 0.1–0.15 ммоль/мг хл/час. Можно предположить, что клеточная концентрация кислорода уменьшается из-за нарушения фотосинтеза связанного с лишением серы. В частности, происходит нарушение синтеза белка D1 в ФС2, которое приводит к замедлению цикла репарации ФС2 и, как следствие, к снижению содержания активных центров ФС2 [95]. Данный процесс инактивации ФС2 в голодающих клетках может быть важным и необходимым для самопроизвольного установления анаэробных условий в фотобиореакторе. Таким образом, голодание культур цианобактерий по макроэлементам, может рассматриваться в качестве метаболических подходов повышения продукции водорода на свету. Необходимо при этом отметить, что феномен фотообразования водорода в этих условиях является результатом синергического действия двух стрессовых факторов: дефицита серы и кислорода [24].

Еще одним эффективным подходом в повышении продуктивности клеток цианобактерий в продукции водорода является использование ингибиторов электронного транспорта и ферментов. В настоящее время используются более 15 различных видов ингибиторов, среди которых известны как наиболее широко применяемые DCMU, DCMU, карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон (CCCP), метилвиологен (MB), цианид калия (KCN), хлорамфеникол и 2,5-дибром-3-метила -6-изопропил-п-бензохинон (DBMIB), пентахлорфенол (PCP), малонат (Таблица 2).

Таблица 3. Основные виды ингибиторов электронного транспорта и ферментов, используемые для повышения продукции водорода у цианобактерий

| Ингибитор | Сокращенное название | Систематическое название | Формула | Механизм действия | Протестированные цианобактерии | Производство $H_2$ | Литература |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Диурон | DCMU | 3-(3,4-Дихлорфенил) -1,1-диметилмочевина | $C_9H_{10}Cl_2N_2O$ | Ингибитор фотосистемы 2 (ФС2), который ограничивает перенос электронов от ФС2 к восстановленному пулу PQH2 (далее «пул PQ» относится к восстановленному пулу $PQH_2$) | *Anabaena siamensis* TISTR 8012 | 22.0 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [51] |
| | | | | | *Anabaena cylindrical* | 30.8 мкл $H_2$/мг сухая биомасса/час | [96] |
| Карбонилцианид м-хлорфенилгидразон | CCCP | 3-(хлорфенил) гидразоно] малононитрил | $C_9H_5ClN_4$ | Ингибирует фотохимическую активность ФС 2 | *Aphanothece halophytica* | 39.5 мкмоль $H_2$/гр сухая биомасса/час | [97,98] |
| | | | | | *Nostoc muscorum* | 5 мкмоль $H_2$/мг прот/час | [99] |
| Дибромтимохинон | DBMIB | 2,5-дибром-3-метил-6-изопропил-п-бензохинон | $C_{10}H_{10}Br_2O_2$ | Ингибитор цитохрома b6f, который увеличивает степень химического восстановления пула пластохинона (PQ). | *Synechocystis* sp. PCC 6803 | 22.0 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [100] |
| | | | | | *Nostoc muscorum* | 15 моль $H_2$/мг прот/час | [101] |
| Цианид калия | KCN | - | KCN | Ингибитор цитохромоксидазы, ингибирующий все терминальные оксидазы. | *Synechocystis* sp. PCC 6803 | 147 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [102] |
| | | | | | *Synechocystis* sp. PCC 6803 | 3.1 мкмоль $H_2/10^{10}$ клеток | [100] |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Малонат | - | - | $CH_2(COO)_2^{2-}$ | Ингибитор, ингибирующий фермент сукцинатдегидрогеназы до 75%. | *Anabaena siamensis* TISTR 8012 | 8.7 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [51,103] |
| | | | | | | 0.5 мкмоль $H_2/10^{10}$ клеток | [96] |
| Ротенон | - | - | $C_{23}H_{22}O_6$ | Сильно ингибирует перенос электронов в NDH-I за счет блокирование окисления кластеров Fe-S NDH-I | *Anabaena siamensis* TISTR 8012 | 18.7 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [51] |
| Цианид | - | Цианид | $CN^-$ | Может ингибировать перенос электронов в дыхательной терминальной оксидазе, хиноло-ксидазе и Cyt ox. | *A. siamensis* TISTR 8012 | 22.0 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [51] |
| | | | | | *Synechocystis* sp. PCC 6803 | 3.1 мкмоль $H_2/10^{10}$ клеток | [100] |
| Атразин | - | 6-хлор-N2-этил-N4-(пропан-2-ил)-1,3,5-триазин -2,4-диамин | $C_8H_{14}ClN_5$ | Ингибирует фотосинтез | *Nostoc muscorum* | 145 мкмоль $H_2$/мл прот/час | 100, 104] |
| Метрибузин | - | 4-Амино-6-трет-бутил-3-метилсульфанил-1,2,4-триазин-5-он | $C_8H_{14}N_4OS$ | Он действует путем ингибирования фотосинтеза путем разрушения фотосистемы 2. | *Nostoc muscorum* | 145 мкмоль $H_2$/мл прот/час | [98] |
| Флавон | - | 2-фенил-4H-1-бензопиран-4-он | $C_{15}H_{10}O_2$ | Может ингибировать перенос электронов в NDH-II | *Cyanothece* sp. Miami BG 043511 | 16.4 мкмоль $H_2$/гр сухая биомасса/час | [105] |

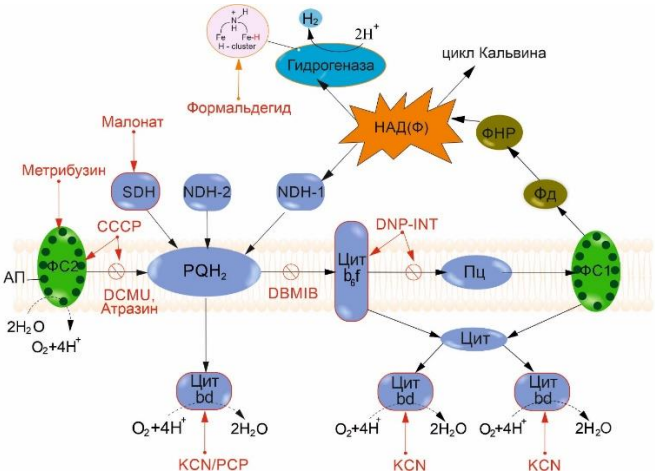



Рис. 10. Схема основных путей влияния разичных ингибиторов, используемых для увеличения производства биоводорода цианобактериями. Сокращения: PSI, фотосистема I; ФСII, фотосистема II; $PQH_2$, восстановленный пул пластохинона; Cyt $b_6f$, цитохром $b_6f$; ПК, пластоцианин; Cyt c553, цитохром c553; FNR, ферредоксин: НАДФ+редуктаза; Fd, ферредоксин; H2ase, двунаправленная гидрогеназа; цикл CBB, цикл Кальвина-Бэсшема-Бенсона; NDH-1, НАДФН-дегидрогеназа (комплекс I); NDH-2, НАДН-дегидрогеназа 2 типа; Cyd, хинолоксидаза, CtaI, цитохром-с-оксидаза; CtaII, альтернативная цитохром-с-оксидаза; СДГ, сукцинатдегидрогеназа[78].

Согласно известным данным, использование каждого из этих ингибиторов потенциально может привести к увеличению продукции $H_2$ клетками цианобактерий. Основные точки воздействия ингибиторов и пути блокирования ими работы той или иной системы водородного метаболизма у цианобактерий представлены на рисунке 10.

Также, DCMU является одним из широко используемых ингибиторов электронного транспорта**,** структура молекулы которого наиболее сходна со структурой однократно восстановленного пластохинона, что объясняет прочное связывание этих молекул в центре связывания хинона в реакционном центре ФС2. Использование DCMU направлено на угнетение активности

данной фотосистемы и созданию анаэробных условий благоприятных для продуцирования молекулярного водорода. Таким образом, DCMU действуя как аналог хинона, связывается с QB ФС2 и блокирует передачу электронов от QA (Рисунок 10). Увеличение продукции водорода клетками цианобактерий в присутствии DCMU показано в ряде работ [106]. Так Cournac и другие, 2004, сообщили о более высоком производстве $H_2$ клетками *Synechocystis* sp. PCC 6803 в присутствии 75 ммоль DCMU в темновых, анаэробных условиях [87].

Другим не менее известным ингибитором ФС2 у цианобактерий и микроводорослей является карбонилцианид м-хлорфенилгидразон **(**СССР**).** Аналогично DCMU, карбонилцианид м-хлорфенилгидразин ингибирует фотохимическую активность ФС2, что приводит к снижению продукции $O_2$. Сообщается, что СССР ингибирует фотохимическую активность ФС2 при освещении у cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Nostoc* sp. и *Lyngbya* sp. [106]. Есть сведения об увеличении продукции $H_2$ под действием СССР у *Oscillatoria chalybea* и *Synechocystis* sp. PCC 6803. А также имеются сведения об ингибировании синтеза АТФ под действием СССР которое приводило к увеличению скорости темнового дыхания у цианобактерий *Anabaena* variabilis и *Anacystis* nidulans [100].

Такие ингибиторы, как KCN и PCP блокируют хинолоксидазу, приводя к тому, что пул PQ будет более восстановленным [16]. Кроме того, KCN может блокировать процесс поглощения $H_2$ [107] или блокировать перенос электронов от цитохрома $b_6f$ к фотосистеме 1 за счет подавления активности пластоцианина, как это предполагалось в работе авторов Berg and Krogmann [108], аналогично DBMIB. Показано, что DBMIB участвует в регуляции активности генов ассимиляции нитратов [88, 109] а ингибирование ассимиляции нитратов в свою очередь приводит к увеличению продукции $H_2$. Однако необходимо отметить, что имеются сведения и об обратном эффекте DBMIB, при котором наблюдается снижение выработки фотоводорода, что требует дополнительного изучения данного ингибитора.

Следующая часть серии опытов посвящена изучению влияния ингибитора фотосинтеза DCMU при освещении, как фактора влияющего на ход фотосинтетических процессов в

клетках цианобактерий и способствующего выделению водорода.

DCMU был внесен в суспензии культур цианобактерий однократно для создания анаэробного состояния, после чего проводили анализ эффекта его воздействия на накопление водорода через каждые 24 часа в течении 3 суток.

С целью определения оптимальных концентраций DCMU, положительно влияющих на фотопродукцию водорода в эксперименте использованы следующие его значения: 10 мкмоль, 30 мкмоль и 45 мкмоль. Для измерений клетки собирали центрифугированием и суспендировали в среде, не содержащей азота, до конечной концентрации $OD_{730}$–1,5. Указанные концентрации DCMU вносили во флаконы с ГХ. Клетки инкубировали в атмосфере аргона в течение 72 ч с интенсивностью света 30 мкмоль фотоны/м$^2$/сек при 25° С.

Согласно полученным результатам у всех культур исследованных штаммов максимальный выход $H_2$ при концентрациях DCMU 10 мкмоль и 30 мкмоль наблюдается через 24-48 ч опыта после истощения в среде кислорода, затем в последующие сутки отмечается уменьшение концентрации водорода (рисунок 16, 17).

Установлено, что все исследованные штаммы цианобактерий продуцировали водород при внесении DCMU в концентрации 10 μM. В данных условиях выход водорода у контрольного штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803 через 24 часа составляет 0,001 мкл $H_2$/мг хл, через 48-72 часа этот показатель равен 0,025-0,021 мкл $H_2$/мг хл соответственно. Выход водорода клетками штамма *Phormidium* Kützing B-26 составил 0,087 мкл $H_2$/мг хл через 24 часа, а затем в течение следующих 48 часов выделение водорода начинает снижаться и составляет 0,038-0,014 мкл $H_2$/мг хл соответственно. Аналогичные данные получены и для опытного штамма *Synechococcus* sp. I12 максимальное накопление водорода для которого 0,033 мкл $H_2$/мг хл было отмечено через 24 часа, а затем наблюдается снижение его концентрации.

Значительно высокая способность выделять водород при данной концентрации ингибитора наблюдается у опытного штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220. Среди исследованных штаммов *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 имеет самые высокие

показатели накопления водорода. Так через 48 ч фотопродукция водорода этой культурой была равна 7,973 мкл $H_2$/мг хл, через 72 часа этот показатель снизился до 7,059 мкл $H_2$/мг хл. Необходимо отметить, что как и предполагалось нами эти показатели выше, чем водородная продуктивность этого же штамма, достигнутая в условиях освещения при отсутствии воздействия ингибитора фотосинтеза.

Также необходимо отметить, что несмотря на краткосрочный стимулирующий эффект данного ингибитора фотосинтеза на накопление водорода, который продолжался в течение 2 суток при более длительном его воздействии наблюдается снижение фотопродукции молекулярного водорода. Следующее за стимулирующим эффектом ингибирующее действие DCMU на фотопродукцию водорода возможно обусловлено подавлением ФС2-зависимого пути образования водорода, за счет его токсического действия, в результате которого происходит выделение кислорода в среду которое в свою очередь дополнительно ингибирующее воздействует на фотопродукцию водорода. Об этом свидетельствуют полученные данные по накоплению 3 газов: кислорода, водорода и азота в среде клетками штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 в анаэробных условиях при воздействии 10 мкмоль DCMU (рисунок 11).

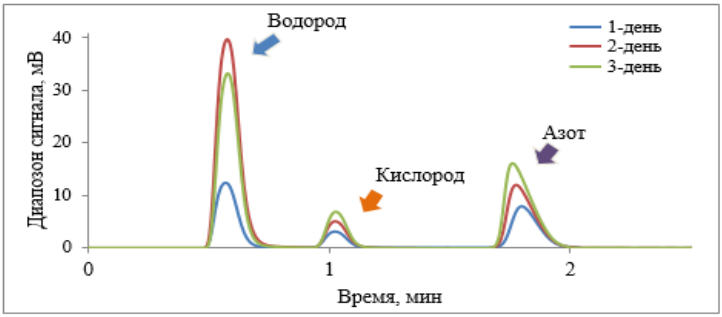



Рис. 11. Фотобиологическое производство $H_2$, $O_2$ и $N_2$ клетками штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 в анаэробных условиях с интенсивностью света 30 мкмоль фотоны/м$^2$/сек в течение 1-3 дней после добавления 10 мкмоль диурона. Сокращенное название: мВ – напряжение.

Согласно полученным результатам, в первые двое суток после внесения 10 мкмоль DCMU клетки штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 в анаэробных условиях начинают активно производить водород, тогда как на третьи сутки наблюдается снижение выделения водорода и заметное увеличения продуцирования кислорода и азота.

Увеличение концентрации ингибитора фотосинтеза DCMU до 30 мкмоль и 45 мкмоль в среде положительного влияния на фотопродукцию водорода клетками цианобактерий не оказала. Так, при концентрации DCMU 30 мкмоль получены значительно низкие показатели максимального выхода водорода клетками цианобактерий (рисунок 12).

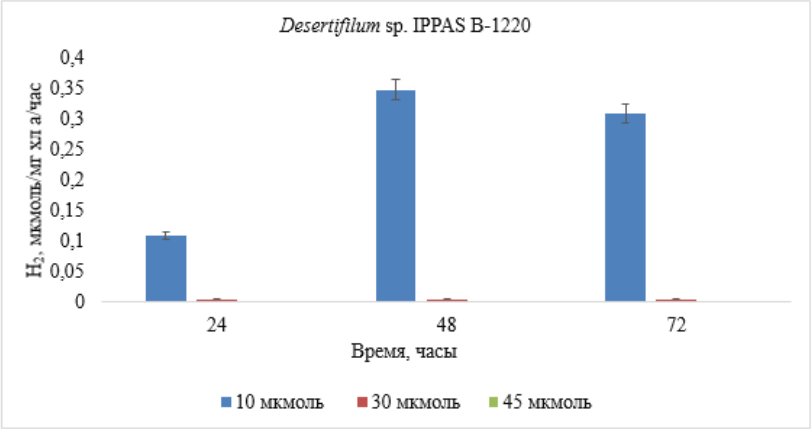



Рис. 12. Изучение влияния трех разных концентраций ингибитора DCMU (10 мкмоль, 30 мкмоль, 45 мкмоль) на выделение водорода штаммом *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220

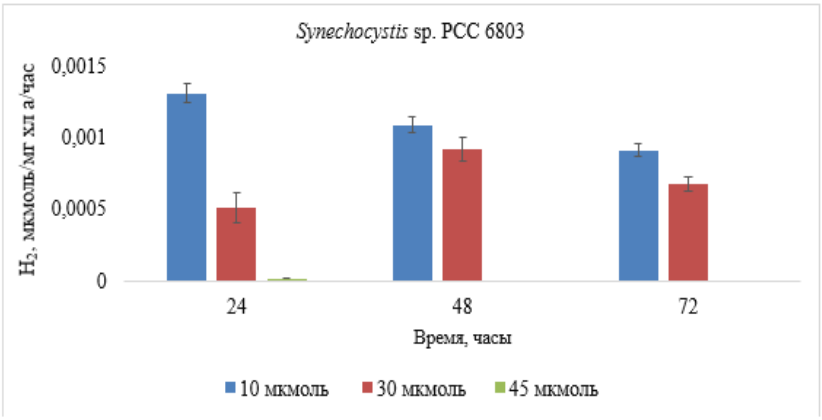



Рис. 13. Изучение влияния трех различных концентраций диурона на интенсивность выделения водорода штаммом *Synechocystis* sp. PCC 6803

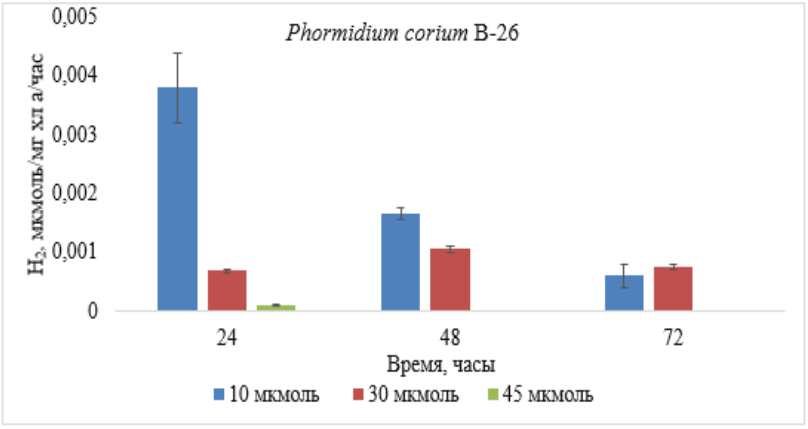



Рис. 14. Изучение влияния диурона на интенсивность выделения водорода штаммам *Phormidium corium* B-26

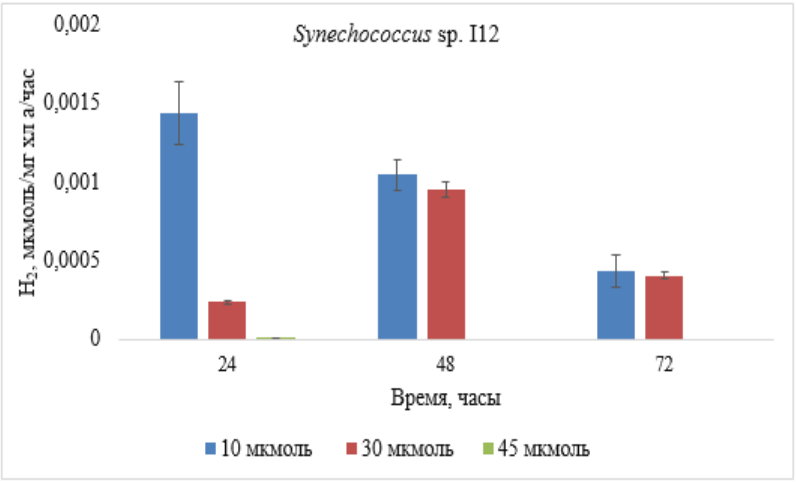



Рис. 15. Изучение влияния диурона на интенсивность выделения водорода штаммам *Synechococcus* sp. I12

Согласно полученным результатам, в данных условиях максимальный выход водорода для штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 составил 0,129 мкл $H_2$/мг хл, что почти в 61 раз меньше, чем накопление водорода этим же штаммом при воздействии DCMU в концентрации 10 мкмоль. Остальные исследованные штаммы цианобактерий в разной степени проявляли способность к выделению молекулярного водорода при данной концентрации ингибитора фотосинтеза. Однако необходимо отметить выявленную закономерность общую для всех исследованных штаммов, как значительно низкий максимальный выход водорода при данной концентрации DCMU. Так максимальное накопление водорода для контрольного штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803 составил 0,021 мкл $H_2$/мг хл на второй день экспозиции. Для штаммов *Phormidium* Kützing B-26 и *Synechococcus* sp. I12 эти показатели были равны 0,024-0,021 мкл $H_2$/мг хл соответственно.

В вариантах опыта с концентрацией ингибитора фотосинтеза DCMU 45 мкмоль выделение водорода клетками всех исследованных цианбактерий не наблюдалось.

Таким образом, в ходе исследования было выявлено, что оптимальной концентрацией ингибитора фотосинтеза DCMU для получения водорода было 10 мкмоль. Установлено, что DCMU стимулирует фотовыход водорода клетками цианобактерий в течение первых 2 дней, после чего наблюдается обратный эффект его воздействия.

Помимо подбора активного продуцента молекулярного водорода немаловажным фактором в этом направлении является и научные исследования, направленные на повышение активности выделения водорода клетками продуцента. Поэтому изучение вопросов оптимизации процесса культивирования цианобактерий с целью повышения эффективности преобразования ими субстрата в водород, различных факторов стимулирующих выход водорода их клетками представляется актуальным и необходимым.

Как и предполагалось нами выход молекулярного водорода в присутствии ингибитора выше, чем водородная продуктивность этого же штамма, достигнутая в условиях освещения при отсутствии его воздействия. В литературе имеются сведения о том, что на анаэробной стадии голодания часть центров ФС2 реактивируется и может донировать электроны на гидрогеназу по цепи промежуточных переносчиков электронов. Отмечается что, в присутствии DCMU, который являются ингибиторами Qb связывающего сайта в ФС2, выход водорода в голодающих клетках снижается примерно на 70% по сравнению с необработанными клетками [100]. Из этого следует, что ФС2 играет основную роль в фотообразовании водорода. В наших исследованиях, показано наличие стимуллирующего эффекта DCMU в концентрации 10 мкмоль на продукцию водорода. Фотопродукция молекулярного водорода несколько возрастает в обработанных клетках, очевидно, из-за снижения содержания кислорода в результате ингибирования ФС2. Так необходимо отметить что все исследованные штаммы выделяли наибольшее количество водорода в сравнении с необработанными клетками цианобактерий. Однако увеличение концентрации DCMU и более продолжительное его воздействие приводит к снижению фотопродукции молекулярного водорода возможно связанное с

его токсическим действием. В вариантах опыта с концентрацией ингибитора фотосинтеза DCMU 30 мкмоль получены значительно низкие показатели максимального выхода водорода клетками всех штаммов цианобактерий. Добавление концентрации 45 мкмоль этого ингибитора в клеточную суспензию приводило к практически полному подавлению фотообразования водорода у всех исследованных культур. Этот эффект свидетельствует о строгой необходимости фотосинтетического транспорта электронов на участке между ПХ пулом и Фд для фотопродукции водорода.

В целом незначительное остаточное выделение водорода в клетках обработанных более высокой концентрацией и при длительном воздействии ингибитора может быть связано с обратным восстановлением Фд от НАД(Ф)Н при высоком содержании последнего. Также незначительная генерация водорода возможна в реакциях ферментативного брожения.

Не менее эффективным метаболическим подходом увеличения продуктивности производства биоводорода клетками цианобактерий является также включение в среду различных экзогенных доноров электронов. Известно, что на активность фермента нитрогеназы влияет источник углерода. В присутствии простых органических соединений увеличивается выработка водорода, поскольку донирование электронов кофакторными соединениями повышает активность нитрогеназы. Так, сообщается что добавление различных сахаров стимулировало выработку водорода, при этом при добавлении маннозы, отмечена наивысшая скорость – 5,58 нмоль водорода на мг сухого веса в час [55].

Хотя большинство цианобактерий поглощают красный свет с длиной волны около 680 нм, потребность в производства водороде для различных типов цианобактерий отличается. Интенсивность света при выделении биоводорода напрямую влияет на активность водородных ферментов в клетках [110-118].

Многие штаммы цианобактерии приспособлены к выделению водорода в темной и светлой среде, что, в свою очередь, напрямую связано с активностью генов, обнаруженных у видов [7, 52, 53, 55]. Кроме того, культура *Spirulina platensis*

интенсивно выделяет водород при температуре 30°C в условиях анаэробиоза и недостатка света [53]. Выделение водорода штаммом *Oscillatoria* sp. Miami BG7 наблюдалось в анаэробных условиях в темной среде. Оптимизация показателей температуры и pH играет важную роль в повышении способности цианобактерий катализировать водород, контролируя обмен веществ путем регулирования ферментативных реакций. Согласно опубликованным данным, виды цианобактерий имеют температурные различия в производстве водорода [7].

Согласно полученным результатам Kossalbayev и другие (2020) некоторые штаммы цианобактерии отличались более высоким выделением $H_2$, в темноте чем при свете. В этих темных условиях самый высокий результат был зафиксирован в штамма *Anabaena variabilis.* В приведенной литературе производство $H_2$ в световой среде часто тесно связано с действием нитрогеназы. Однако цианобактерии приспособлены к распределению энергии $H_2$ в темных и светлых средах. Производство водорода в темных условиях происходит в присутствии сахара, накопленного в результате фотосинтеза, и через экзогенный ферментативный процесс. Таким образом, согласно полученным нами результатам можно считать, что после 24-часовой инкубации уровень запасов гликогена в клетках достаточны для получения $H_2$ в темных анаэробных условиях [78].

Как сообщается, получение водорода из штаммов *Anabaena* sp. UTEX 1448 был изучен Vargas и другие, в котором оптимальная освещенность для выделения водорода составляет 2220 люкс [110]. Согласно исследованию Melitos и другие, интенсивность света 32 Вт/м2 была благоприятной для производства молекулы водорода штамма *Anabaena cylindrica*.

Кроме того, дикий штамм *Anabaena variabilis* ATCC 29413 и его мутант PK84 были изучены на получение водорода и было обнаружено, что они выделяют более активный $H_2$ на свету, чем в темноте [119]. Изучена света зависимость нескольких видов штаммов цианобактерий в лабораторных условиях. Штамм *Anabaena cilindrica* выделял водород в атмосфере аргона в течение 30 дней при ограниченном освещении (интенсивность

света 6,0 Вт/м$^2$) и 18 дней при сильном освещении (интенсивность света 32 Вт/м$^2$). Кроме того, есть информация о том, что низкая интенсивность света положительно влияет на некоторые виды цианобактерий. Например, выделение водорода в штаммах *Anabaena cylindrica* при уменьшенном количестве света приводит к спаду азота, которая результате повышается активность водородных ферментов [78]. Влияние света на продукцию водорода нитрогеназы большинством цианобактерий хорошо изучено. Bolatkhan и др. (2019) в своем исследовании показали, что оптимальный свет для выделения водорода штаммами цианобактерий находится в пределах 20-60 Вт/м$^2$ [14].

Наша команда провела много исследований, чтобы изучить влияние света на выделение водорода. Среди них с рисовых полей были выделены гетероцистные азотфиксирующие цианобактерии. Для изучения действия света, три исследуемых штамма культивировали в идентичных анаэробных условиях, при освещении 30 мкмоль фотоны/м$^2$/сек при непрерывном барботировании воздухом. Биомассу собирали центрифугированием и суспендировали в среде, не содержащей азот, изначальная оптическая плотность суспензии для каждой культуры составила – 1.5 при 730 нм. Затем для определения выделения водорода 7.5 мл клеточной суспензии переносили в 24 мл флаконы с ГХ и газовую фазу флаконов заменяли на аргон. Флаконы инкубировали в течение 166 ч при температуре 30ºC в темноте.

Согласно полученным результатам выделение водорода в темноте наблюдалось у всех исследованных культур. Наибольшей была продуктивность водорода у штамма *Nostoc calsicola* RI-3, клетки которого начали выделять водород через 24 ч после дегазации в темноте. Выход водорода к этому времени составил 0.005 мкмоль $H_2$ мг/хл а/ч. Максимальное накопление водорода данной культурой отмечено через 72 ч инкубации, которое при этом составило 0.032 мкмоль $H_2$ мг/хл а/ч, в последующие часы эксперимента наблюдается медленное снижение выделения водорода, что естественно связано с

полным потреблением имеющихся в среде питательных субстратов (Рис. 16).

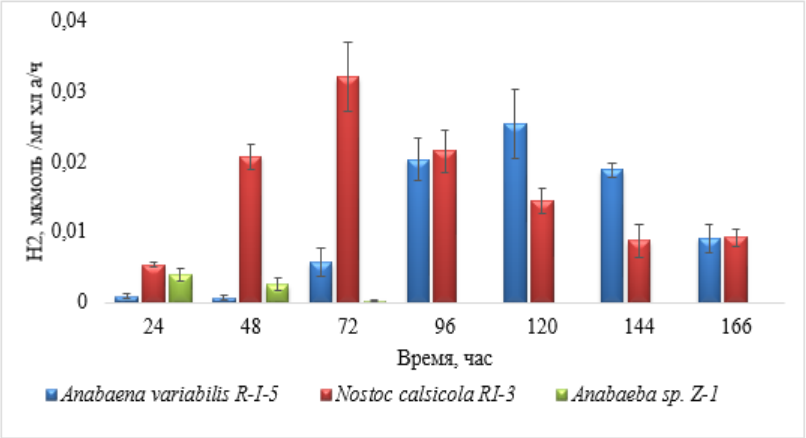



Рис. 16. Выделение водорода исследуемыми штаммами цианобактерий в анаэробных условиях в темноте

Остальные штаммы обладали меньшей водород продуцирующей активностью в темноте по сравнению с *Nostoc calsicola* RI-3. При этом, сравнительно более высокий уровень продукции $H_2$ наблюдался у штамма *Anabaena variabilis* R-I-5. Эти два штамма характеризовались различными значениями выхода водорода и отличались между собой по времени его максимального накопления. Так, накопление $H_2$ клетками *Anabaena variabilis* R-I-5 через 24 часа составило 0.0008 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч, и через 120 часа наблюдалось максимальное продуцирование $H_2$ равное 0.025 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч. Среди исследованных штаммов цианобактерий, значительно низкая способность выделять водород в темноте выявлена у штамма *Anabaena* sp. Z-1. Незначительное выделение водорода этим штаммом отмечено через 24 ч инкубирования, данный показатель к этому времени составил 0.004 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч, после чего в дальнейшем наблюдается снижение этого

показателя, а после 72 часов продукция водорода и вовсе не наблюдается.

На следующем этапе работы было изучено накопления водорода исследуемыми штаммами цианобактерий в условиях освещения. Известно, что световая энергия важна для выделения водорода и действует как донор электронов для прямого биофотолиза [2]. В основе феномена фотоиндуцированного выделения водорода микроводорослями лежит процесс фотосинтеза. В ходе фотохимических реакций в тилакоидных мембранах микроводорослей за счет энергии солнечного света при определенных условиях выделяется молекулярный водород. В обычных условиях микроскопические водоросли не образуют водород. Они способны к разложению воды и выделению кислорода при участии двух трансмембранных фотосистем, трансформирующих энергию света в химическую энергию АТФ и НАДФН. Восстановление НАДФ происходит при переносе электронов от восстановленного за счет фотосинтеза ферредоксина к НАДФ при участии Фд: НАДФ-оксидоредуктазы. Активность фотосистемы 2 (ФС2) не является необходимым условием фотовыделения водорода, хотя электроны, поступающие в электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) тилакоидов при фоторазложении воды, могут акцептироваться гидрогеназой. Это приводит к тому, что в течение непродолжительного времени в клетках микроводорослей образуется и кислород, и водород [78].

Прямой биофотолиз цианобактериями является широко используемым методом расщепления воды на $H^+$ и $O_2$ с использованием света в качестве источника энергии. Когда энергия света поглощается клетками цианобактерий, она усиливает окисление молекул $H_2O$ в ФС 2, а высвобождаемые протоны и электроны транспортируются в хлоропласт-ферредоксин через ФС1. Фд играет роль электрона для [FeFe]-гидрогеназ, что способствует восстановлению $H^+$ до молекул $H_2$ [79].

В этом эксперименте исследуемые культуры цианобактерий культивировали аналогично предыдущему эксперименту, условия инкубации клеток при изучении водородной продуктивности были те же и отличались только наличием освещения. Изначальная оптическая плотность суспензии для каждой культуры составила – 1.5 при 730 нм. Выделение водорода штаммами цианобактерий наблюдали при их инкубации в Аргон атмосфере в течение 190 ч при освещенности 30 мклмоль/м$^2$/сек.

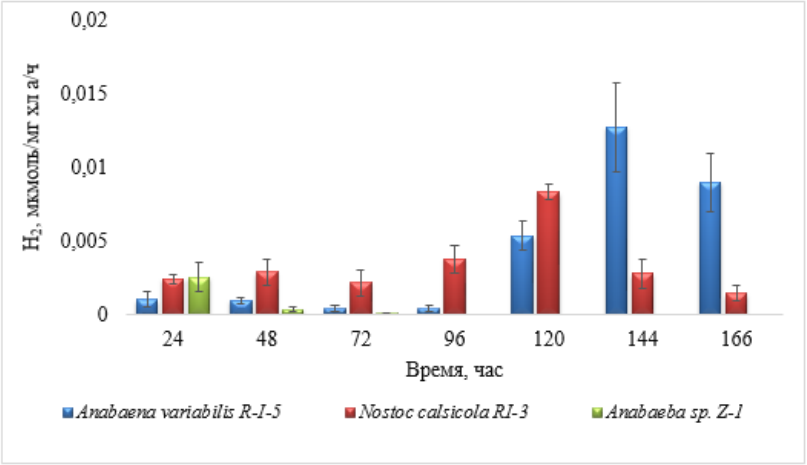



Рис. 17. Выделение водорода исследуемыми штаммами цианобактерий в анаэробных условиях при освещении

В результате проведенных экспериментов было установлено что, наиболее активным продуцентом водорода на свету оказался штамм *Anabaena variabilis* R-I-5. Выработка водорода клетками *Anabaena variabilis* R-I-5 наблюдается на первый день после установления анаэробных световых условий, что в свою очередь подтверждает тот факт, что ферменты активируется при переносе в бескислородную среду. Активное выделение водорода сохраняется в течение шести дней, а затем начинает уменьшаться (Рис. 17). Самые высокий показатель накопления водорода был отмечен через 144 часов, который составил 0.012 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч. Необходимо отметить, что

штамм *Nostoc calsicola* RI-3, активно продуцирующий водород в темноте, в условиях освещения аналогичную активность не проявил. Выделение водорода в условиях освещения через 24 часа составило 0.002 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч, и через 120 часов наблюдалось максимальное продуцирование $H_2$ равное 0,008 мкмоль $H_2$ мг/хл а/ч, далее наблюдается постепенное снижение его выделения. К сведению, в темноте выделение водорода клетками данного штамма было в 3.5 раза больше. Для штамма *Anabaena* sp. Z-1 по выделению водорода наблюдается аналогичная картина как и в первом эксперименте, незначительное продуцирование водорода 0.002 - 0.0003 мкмоль $H_2$/мг хл а/ч отмечено через 24 ч и 48 часов.

Таким образом, в результате проведенных исследований, установлено высокая водород продуцирующая способность в темноте для штамма цианобактерии *Nostoc calsicola* RI-3 и в условиях освещения для штамма *Anabaena variabilis* R-I-5. При этом максимальный выход водорода клетками штамма цианобактерии *Nostoc calsicola* RI-3 в темноте составил 0.032 мкмоль $H_2$ мг/хл а/ч, что почти в 2.5 раза превышает продукцию водорода штаммом *Anabaena variabilis* R-I-5 в условиях освещения. Полученные нами результаты в целом согласуются с литературными данными. В литературе имеются сведения о выделении водорода культурой *Spirulina platensis* Geitl. в анаэробных условиях на свету и в темноте, согласно которым оптимально этот процесс происходит при 32$^{o}$C, полном анаэробиозе в темноте [53]. Также имеются сведения, свидетельствующие об активном выделении водорода клетками *Synechococcus* Nag. PCC 7942 в темноте в анаэробных условиях [44].

Согласно полученным нами экспериментальным данным, как и предполагалось, продукция водорода выделенными новыми штаммами строго зависит от наличия освещения. Оптимальным условием для выделения водорода клетками *Nostoc calsicola* RI-3 и *Anabaena variabilis* R-I-5 оказалось отсутствие освещения, наличие освещения приводило к резкому снижению продуцирования $H_2$. Вероятной причиной этого может быть слишком высокое активирование ФС2, способствующее появлению концентраций кислорода,

ингибирующих процесс выделения водорода, за счет инактивации ферментов гидрогеназы, катализирующих восстановление протонов до молекулярного водорода за счет направленного фотосинтетического потока электронов.

### 2.4. Генетические подходы увеличения выхода водорода клетками цианобактерий

Один из путей оптимизации процесса получения биоводорода базируется на изучении генетического контроля метаболизма водорода и применении генетических подходов для получения эффективных штаммов-продуцентов. Так конструирование генетических мутантов с целью получения фотоводорода является экономически выгодным. Все генетические подходы модификации фототрофных микроорганизмов, в том числе цианобактерий, направлены на повышение выхода водорода путем подавления, введения новых или сверхэкспрессии имеющихся генов. Анализируя имеющиеся в литературе данные можно сказать, что генетические манипуляции с цианобактериями необходимы для устранения следующих основных проблем: 1) присутствие и активность поглощающей гидрогеназы; (2) низкая частота образования гетероцист; 3) конкуренция за восстановители, наличие иных ассимиляционных путей; 4) низкая фотохимическая эффективность светосборных антенн.

Так выделение $H_2$ после генетической модификации некоторых видов цианобактерий было значительно выше, по сравнению с диким типом (93, 6, 120].

Анализируя литературные данные, все получаемые мутанты можно свести к шести основным группам:

Мутанты дефектные по рециклизации водорода, *hup*SL, *hyp*F и др.;

Мутанты с низкой чувствительностью Mo-нитрогеназы к ионам амония;

Мутанты дефектные по генам *het*RFCLN, patS и др., ответственными за образование и подавление гетероцист;

Мутанты с кислородотолерантной гидрогеназой hoxEFUYH и др.;

Мутанты с потоком электронов переориентированным на водородный метаболизм;

Мутанты с уменьшенным содержанием пигментов.

Рассматривая метаболизм азотфиксирующих цианобактерий, можно заметить, что основные генетические подходы увеличения их продуктивности по выходу водорода, связаны с удалением либо инактивацией водородпоглощающей гидрогеназы, с созданием мутантов нечувствительных к аммонию и путем искусственного увеличения количества гетероцист в нитях.

Известно, что в условиях азотфиксации гидрогеназа участвует в рециклизации выделяемого нитрогеназой водорода. Рассматривая и анализируя метаболизм цианобактерий, можно утверждать, что удаление водород поглощающей гидрогеназы может привести к увеличению выхода водорода. Генетические исследования, посвященные данной манипуляции, проводятся давно и описаны они во многих трудах (120-126]. В частности проводится нокаутирование генов большой либо малой субъединицы гидрогеназы HupSL, а также нокаутирование ее регулятора, белка HupR, чтобы таким образом снизить уровень экспрессии гидрогеназы, тем самым увеличив выход $H_2$ [21].

Так, с целью увеличения выделения водорода филаментными азотфиксирующими цианобактериями были получены химическим мутагенезом и изучены мутантные штаммы *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc punctiforme* PCC 73102 и *Nostoc* PCC 7422 [39, 121-123]. Согласно приведенным в этих публикациях результатам, выделение водорода мутантными штаммами в анаэробных условиях увеличилось почти в три раза. Авторы считают, что изменение активности гидрогеназы либо ее функциональных связей с нитрогеназным комплексом в мутантных клетках определяется нарушением общей системы регуляции, контролирующей клеточную дифференцировку, или путей переноса электронов, связанных с метаболизмом азота и водорода. Masukawa и другие [31] сконструировали и охарактеризовали мутанты штамма *Anabaena* PCC 7120 без Hup-гидрогеназы с аминокислотными заменами dc-Q193S и dc-R284H, расположенными в непосредственной близости от FeMo-кофактора нитрогеназы.

Изучение их фотосинтетической активности и способности к выделению водорода в зависимости от температуры, и наличия молекулярного азота показало, что выделение водорода у мутантов мало отличалось от родительского штамма по энергии активации, однако мутант dc-Q193S, в отличие от родительского штамма ΔHup, продемонстрировал более низкий температурный оптимум для выделения $H_2$, кроме того в отличие от родительского штамма выделение водорода у мутантов не ингибировалось даже при 100% $N_2$ в газовой фазе. Это особенно перспективно с практической точки зрения, т.к. позволяет использовать в технологическом процессе более дешевую газовую фазу вместо аргона. Высокие показатели продукции водорода показаны и для мутантного штамма *Synechocystis* PCC 6803 M55, дефектного по *ndh*B гену с ограниченной активностью Hup-гидрогеназы (87).

Следующие генетические манипуляции увеличения продуктивности азотфиксирующих цианобактерий связаны с созданием мутантов, нечувствительных к аммонию. Поскольку высокая концентрация ионов аммония ингибирует процесс выделения водорода за счет репрессии синтеза нитрогеназы и выключения ее активности, увеличение выхода $H_2$ возможно за счет снижения чувствительности нитрогеназы к ионам аммония [50]. Подобного эффекта можно добиться точечными мутациями гена *nif*A, либо выключением одного из генов глутаминсинтазы *gln*A, делающего белок *nif*A нечувствительным к ионам аммония, в результате чего синтез нитрогеназы не зависит от наличия аммония в ростовой среде. Помимо этого путем воздействия на гены, ответственные за транспорт аммония в клетку, тоже возможно получение мутантов, у которых синтез и активность нитрогеназы не будет зависеть от концентрации аммония в среде [124]. Полученные таким образом мутантные штаммы цианобактерий, могут иметь преимущества при использовании для их культивирования сточных вод, содержащих чрезвычайно высокие концентрации аммония, в условиях использования реальных отходов мутантные штаммы, нечувствительные к аммонию.

Кроме этого, активное продуцирование водорода азотфиксирующими цианобактериями также может быть

повышено путем искусственного увеличения количества гетероцист в нитях и, следовательно, концентрации нитрогеназы. Это можно сделать как методами генной инженерии, так и обработкой химическими веществами, такими как 7-азатриптофан. Зная ключевые гены, участвующие в образовании гетероцист и азотфиксации, генетическими подходами можно регулировать частоту образования гетероцист. Так известно, что около 600–1000 генов специфически активируются во время образования гетероцисты. Основным геном, контролирующим образование гетероцист, является ген *het*R, а их подавление регулируется продуктами генов patS и hetN [125]. Сообщается, что генетические манипуляции, приводящие к сверхэкспрессии *het*R гена у *Anabaena* PCC 7120, привели к увеличению частоты образования гетероцист на 29%, тогда как при азотном голодании этот показатель был равен 10% [126]. Кроме генов hetR, patS и hetN, мишенями для генетических манипуляций могут быть и другие гены, участвующие в формировании, поддержании и регулировании гетероцисты. Так, повышая экспрессию гена hglK, можно потенциально укрепить гликолипидный слой гетероцисты, тем самым сводя к минимуму его поломку [127].

Еще одним весьма интересным генетическим подходом увеличения продуктивности цианобактерий по выходу водорода является получение мутантных штаммов с уменьшенным содержанием пигментов, т.е. с меньшим количеством антенного хлорофилла, фикобилиновых пигментов. Считается, что в этом случае фотосинтетический аппарат клетки поглощает меньше фотонов при высокой интенсивности света и таким образом тратит впустую меньше фотонов, поскольку, как известно, при переносе электронов от воды на $CO_2$ или $H_2$ требуется только два фотона т.к. участвуют в этом переносе две фотосистемы. Поэтому, получение мутантов с сокращением количества светособирающих пигментов в фотосинтетическом аппарате позволяет обеспечить 10%-ную конверсионную эффективность солнечной энергии в углеводы, из которых может продуцироваться водородное топливо [128-133]. Так согласно данным Bernat и другие, использование антенна-дефицитного

мутантного штамма *Synechocystis* PCC 6803, предполагает получение до 200 мл $H_2$ в час с 1 литра культуры при непрерывном культивировании. Им также отмечено, что у мутанта без фикобилисом скорость линейного потока электронов была в 5,5 раз выше, чем у штамма дикого типа, тогда как скорость циклического потока электронов оставалась одинаковой для обоих штаммов. Увеличение скорости линейного потока электронов является обязательным условием для увеличения выделения $H_2$ в фотоавтотрофных условиях [96].

Важным генетическим подходом увеличения продуктивности цианобактерий по водороду является решение проблемы чувствительности гидрогеназы к кислороду. Проводятся много исследований по проектированию толерантного к $O_2$ фермента гидрогеназы для устойчивого выделения $H_2$ у цианобактерий. Кроме того проводятся исследования по получению новых рекомбинантных штаммов цианобактерий, несущих кислотоустойчивые гидрогеназы. Так сообщается об интеграции необходимых структурных и вспомогательные генов ответственных за синтез гидрогеназы *Thiocaspa roseoperscina* в хромосому *Synechococcus* PCC 7942 [129]. Введение структурных генов, кодирующих клостридиальную гидрогеназу Fe, в цианобактерию *Synechococcus elongatus* PCC 7942 и их последующая транскрипция и перевод в функциональный выделяющий водород фермент в фотосинтетическом микроорганизме представляет интерес и заслуживает дальнейших исследований. Имеются сведения о получении рекомбинантной *Synechocystis* PCC 6803 путем введения двух структурных генов гидрогеназы и ассоциированных генов его созревания от *Rubrivivax gelatinosus*. Получение и использование таких мутантных штаммов цианобактерий с сверхэкспрессией гидрогеназы толерантной к кислороду позволит обойти необходимость барботирования культуральной среды инертным газом, для создания анаэробных условий.

Генно-инженерные подходы увеличения производства водорода путем переориентации электронного потока на водородный метаболизм получили в последнее время пристальное внимание. Технический подход устранения путей, конкурирующих за электроны, таких как дыхательная электронная

транспортная система, усвоение нитратов и фиксация углерода через цикл Кальвина-Бенсона, может быть очень эффективным и перспективным методом улучшения и оптимизации производства водорода. Так усвоение нитратов является потенциальным конкурентным путем, который может уменьшить поток электронов к метаболизму водорода. Установлено, что у штаммов *Synechocystis* PCC 6803 с нарушенным усвоением нитратов, мутантов по генам ΔHap и ΔHup, удаление обоих генов ΔHap и ΔHup позволило увеличить продукцию водорода [25]. Также инактивация хинолоксидазы тоже привела к увеличению продукции водорода *in vivo* у *Synechocystis* sp. PCC 6803 [88]. Увеличение отношения НАДФН/НАДФ$^+$, также вызывают увеличение продукции водорода НАДФН -зависимой, двунаправленной [NiFe] гидрогеназой в *Synechococus* sp. strain PCC 7002 [130].

Таким образом, увеличение производства водорода может быть достигнуто путем сокращения или устранения конкурирующих биохимических путей.

Подводя итоги можно отметить, что каждая из описанных генетических подходов заслуживает особого внимания и при решении многих фундаментальных проблем методами современной молекулярной биотехнологии может быть очень эффективным и перспективным подходом улучшения и оптимизации производства водорода в цианобактериях.

### 2.5. Технологические подходы увеличения продукции водорода у цианобактерий

Большой вклад в повышение уровня производства биоводорода помимо описанных выше метаболических и генетических подходов вносит разработка инновационных методов культивирования, в частности оптимизация условий культивирования продуцентов и конструирование эффективных фотобиореакторных систем. Оптимальная конструкция фотобиореактора зависит от характеристик штамма цианобактерий, и его производительность зависит от многих физико-химических параметров, влияющих на различные биохимические пути производства водорода.

Основными физико-химическими показателями, влияющими на выход водорода являются pH, температура, интенсивность света, содержание кислорода и углекислого газа, источники и соотношение углерода и азота. Так регулируя эти параметры можно добиться больших результатов в производстве биоводорода. Отмечено, что наиболее оптимальными значениями pH среды для большинства культур цианобактерий является 7-8, температуратурный предел находятся в диапазоне 25-35ºC. К примеру значительным увеличением концентрации гликогена при оптимизации концентрации основных питательных веществ в среде достигнуто увеличение продукции водорода клетками *Synechocystis* sp. PCC 6803 в 150 раз [89]. Расширением фазы экспоненциального роста более чем на 3 дня за счет добавления нитрата в режиме с подпиткой увеличена скорость фиксации углерода на 68,8% для цианобактерий [131].

Свет является одним из самых главных параметров и основным ограничивающим фактором для крупномасштабного производства водорода, поэтому положение источника света очень важно. Внутри фотобиореактора имеются близкая к освещаемой поверхности, фотонная зона, и темная зона. Темная зона обусловлена поглощением света клетками и зависит от условий освещения и поглощающих свойств клеток цианобактерий. Поскольку цианобактерии поглощают преимущественно красный свет около 680 нм, для удовлетворения этой потребности, рекомендуется в специализированных биореакторах конструировать панели красного света, чтобы обеспечить красный свет для систем культивирования. В результате перемешивания ячейки будут циркулировать между светлой и темной зоной реактора с определенной частотой и регулярными интервалами, которые зависят от конструкции реактора и подачи газа. Положение источника света, а также гидродинамика газ-жидкость также влияют на рост цианобактерий, а также на выработку водорода [119, 66, 133].

Для крупномасштабного производства биоводорода культурами цианобактерий необходимы фотобиореакторы, отвечающие нескольким условиям:

1) Фотобиореакторы должны быть закрытой системой, чтобы полученный водород мог быть собран без каких-либо потерь.

2) Конструкция реактора должна обеспечивать простоту эксплуатации и удобство очистки и стерилизации.

3) Прозрачность (для проникновения света) и долговечность материала конструкции.

4) Фотобиореакторы должны обеспечивать высокое отношение поверхности к объему и интенсивное перемешивание культуральной среды.

В настоящее время известны открытые и закрытые системы для массового культивирования фототрофных микроорганизмов с целью дальнейшего получения биоводорода. Их можно разделить на 4 основные группы (Рисунок 18):

- Трубчатый фотобиореактор;
- Плоскопанельный фотобиореактор;
- Фотобиореактор с вертикальной колонкой;
- Фотобиореактор под открытым небом.

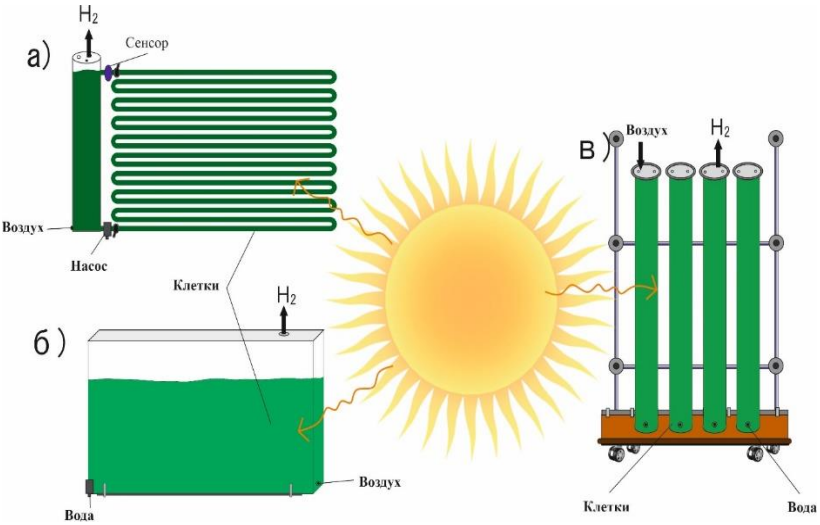



Рис. 18. Виды биореакторов используемые для культивирования цианобактерий и их преимущества [133]

Однако необходимо отметить, что открытые системы культивирования цианобактерий (пруды и бассейны) подходят только для производства биомассы. Несмотря на имеющиеся у них преймущества, они не могут обеспечить анаэробные условия, необходимые для производства водорода, и такие параметры, как температура, pH и концентрация питательных веществ контролировать в них достаточно сложно.

В то время как, в закрытых системах культивирования цианобактерий, кроме того, что степень контроля всех этих важных параметров очень высока, имеется возможность создания анаэробных условий, что является главным при получении водорода.

На сегодняшний день известны различные типы фотобиореакторов которые были использованы для культивирования цианобактерий с целью производства водорода. Так, несколько типов закрытых фотобиореакторов были разработаны с целью коммерческого масштаба культивирования микроводорослей, для получения биоводорода [22].

Таблица 4. Выход водорода различными штаммами цианобактерий в разных фотобиореакторах

| **ФБР** | **Штаммы** | **Выход водорода** | **Литература** |
|---|---|---|---|
| Трубчатый фотобиореактор | *Anabaena variabilis* PK84 | 8 мл $H_2$/л/час | [134] |
| | *Anabaena variabilis* PK84 | 0.82 мол $H_2/м^3$/час | [85] |
| | *Anabaena* sp. PCC 7120 | 14.9 мл $H_2$/л/час | [122] |
| | *Anabaena* AMC 414 | 4.1 мл $H_2$/г биомасса/час | |
| | *Anabaena azollae* | 13 мл $H_2$/л/час | [134] |
| Фотобиореактор с вертикальной колонкой | *Anabaena variabilis* CCAP 1403 | 14 мл $H_2$/г биомасса/час | [135] |
| | *Anabaena variabilis* PCC 7120 ΔHup | 13.8 мл $H_2$/л/час | [135] |
| | *Synechocystis* PCC sp. 6803 | 40.6 мкмоль $H_2$/мг хл/час | [59] |
| Плоскопанельный фотобиореактор | *Nostoc* PCC 7120 ΔhupW | 6.5 мл $H_2$/л/час | [52] |
| | *Anabaena variabilis* (ATCC 29413) | 4.1 мл $H_2$/г биомасса/час | [125] |

Из имеющегося разнообразия фотобиореакторов, предназначенных для получения водорода на основе микроводорослей и цианобактерий, хочется отметить 3 основных вида биореакторов, наиболее широко используемых для получения водорода: трубчатый фотобиореактор, фотобиореактор с плоской панелью и фотобиореактор с вертикальной колонной.

Трубчатые фотобиореакторы, представленные длинными прозрачными трубками диаметром от 3 до 6 см и длиной от 10 до 100 м, считаются наиболее практичными для цианобактерий. Имеются различные конфигурации трубчатых фотобиореакторов, в которых трубы могут быть расположены различными способами: так они могут располагаться в горизонтальной плоскости в виде прямых труб с различным количеством изгибов; в вертикальной плоскости, расположенные в виде ограждения с помощью изгибов или соединенных коллекторами; горизонтальные или наклонные, параллельные трубы, соединенные коллекторами. Во всех видах ферментеров культуральная жидкость прокачивается через эти трубки с помощью механических или воздушных насосов. В горизонтальном трубчатом фотобиореакторе НХТР, состоящем из параллельных труб наклоненных под уклоном, подача воздуха обеспечивается в нижней части реактора в выбранные трубы что позволяет свободно подниматься пузырькам газа. Данная система труб помогает уменьшить задержку газа и улучшает удаление кислорода. Спиральные трубчатые фотобиореакторы построенные намоткой прямых труб из гибкого пластика в трехмерные спиральные рамки с необходимым наклонением были использованы при двухступенчатом получении водорода с использованием *Anabaena azollae*, выход водорода составил при этом 13 мл $H_2$/л/час. Характеристики массообмена трубчатых фотобиореакторов и их продуктивности по водороду варьируют в зависимости от формы реактора и типа используемого смешивания [70]. Основными недостатками таких биореакторов являются сложность очистки труб вследствие их обрастания культурой цианобактерий, а также возможность фотоингибирования процесса.

Фотобиореакторы в виде вертикальных колонн изготовлены из высококачественного стекла и окружены водяной рубашкой, которая, хотя и позволяет поддерживать температуру циркулирующей воды, обеспечивает адекватный вход света. В верхней и нижней части реактора предусмотрены входы и выходы среды для газов, таких как аргон, и для водорода. Свежая среда подводится в резервуар сверху. Продуктивность биомассы в таких биореакторах существенно варьируется в течение года, максимальная продуктивность летом может быть в несколько раз выше, чем зимой.

Типичный фотобиореактор с плоской панелью состоит из рамы из нержавеющей стали и трех панелей из поликарбоната. Фотобиореактор может состоять из одного либо двух отсеков, расположенных рядом. Передний отсек содержит цианобактериальную культуру. В данной конструкции используется искусственный свет, в качестве источника света на одной стороне реактора могут располагаться вольфрам-галогенные лампы. Мембранный газовый насос циркулирует газ через разбрызгиватели в нижней части реактора. Добываемый газ собирается в газовый мешок. В этой реакторной системе сосуды под давлением предотвращают колебания давления в системе рециркуляции газа, а клапан поддерживает постоянное давление на входе регулятора массового расхода. Такие фотобиореакторы привлекают все больше внимания к культивированию фотосинтезирующих цианобактерий из-за особенностей большой площади поверхности освещения, короткого светового пути, низкой стоимости и простоты очистки. Однако несмотря на то, что использование таких фотобиореакторов часто позволяет получить высокую плотность клеток и высокую продуктивность водорода, их трудно масштабировать, а также они имеют ограничения, связанные с трудностью контроля температуры культивирования, образованием биопленки на поверхности фотобиореактора и значительным гидродинамическим напряжением. И все же, при их использовании можно достичь высокой фотосинтетической эффективности и эффективного контроля давления газа, вследствие чего этот тип биореактора считается более экономичным по сравнению с другими

фотобиореакторами. Так, на основе сравнительного анализа фотобиореакторов, был сделан вывод, что плоскопанельный фотобиореактор больше подходит для производства водорода, потому что в них можно было бы избежать обратного давления накопленного водорода [133, 135-139]. Различные модификации конструкции таких фотобиореакторов для производства водорода из микроводорослей были разработаны и предложены [140-149].

Kondo и другие сконструировали многослойный фотобиореактор, который позволил используя сетки и мембраны разбавлять сильный падающий свет и равномерно рассеивать его в фотобиореакторе для улучшения характеристик производства фото-водорода сконструировали фотобиореактор, состоящий из четырех равных отсеков [150].

При проектировании и эксплуатации любых фотобиореакторов необходимо учитывать следующие основные моменты, связанные с регуляцией интенсивности освещения: как использовать соответствующие источники света (интенсивность и длина волны), как повысить эффективность преобразования света и как при этом поддерживать соответствующую концентрацию клеток при длительной работе. Так в предложенной конструкции, солнечный свет передавался в фотобиореактор через оптические волокна бокового света, которые непосредственно погружались в ферментативную культуру для обеспечения высокой интенсивности света и равномерного его распределения. При этом, солнечный свет собирали с использованием линз Френеля, а затем пропускали через оптическое волокно с торцевым светом к оптическим волокнам с боковым светом. Такая система слежения за светом заставляет вращаться каждую линзу в направлении положения солнца так, чтобы оптическое волокно бокового света могло получать максимальную световую энергию от солнечного света в дневное время. Внутреннее освещение может поддерживать равномерное распределение света и интенсивность света внутри фотобиореактора и избегать экранирующих эффектов из-за увеличения плотности клеток. Отмечена хорошая производительность этого фотобиореактора, скорость образования $H_2$ и выход составил 22.7 мл/л/ч и 62.3% при

использовании *Rhodopseudomonas* palustris с использованием ацетата в качестве источника углерода [151-153].

Помимо улучшения технологических характеристик фотобиореакторов, одним из интересных технологических подходов увеличения продукции водорода клетками цианобактерий является иммобилизация их клеток на различных носителях. Поскольку при иммобилизации любые микроорганизмы защищены от неблагоприятных физических, химических и биологических факторов внешней среды, экстремальных температур, обезвоживания, ультрафиолетового излучения, дефицита питательных веществ, токсикантов, получая возможность существовать в относительно постоянных условиях, данный подход может рассматриваться весьма интересной и важной стратегией, способствующей увеличению выхода водорода у цианобактерий. Так иммобилизация цианобактерий в искусственных системах при получении биоводорода, повышает устойчивость их клеток к стрессовым воздействиям и обеспечивает преимущества по сравнению с применением суспензионных культур, что особенно облегчает работы по масштабированию данного процесса.

Известно, что иммобилизация цианобактерий с помощью адсорбции на твердых матрицах или захватом в альгинатных гелях может значительно увеличить функциональное время их жизни, а также число гетероцист в нитчатых цианобактериях. Установлено, иммобилизация культур цианобактерий увеличивала эффективность фотовыделения $H_2$. Так сообщалось, что иммобилизованные цианобактерии ΔhupL *Anabaena* sp. PCC 7120 в фотоавтотрофных условиях показали высокую водород продуцирующую активность [119]. Так успешно иммобилизованы в гелях альгината кальция клетки модельного объекта в водородной энергетике *Synechocystis* sp. PCC 6803 [59]. Установлено, что клетки *Anabaena* N-7363, иммобилизованные в 2% геле каррагинана, выделяют в 2,4 раза больше водорода (до 3.24 ммоль в час на 1 г сухого геля) по сравнению со свободными клетками. Отмечено положительно влияние иммобилизации клеток *C. reinhardtii* в альгинатных гранулах на продукцию водорода, так при иммобилизации снижается в клетках скорость инактивации гидрогеназы

кислородом, поскольку слой альгината ограничивает поступление кислорода внутрь гранул. В результате клетки выделяют больше водорода по сравнению со свободными клетками. При этом отмечено уведичение периода активного выделения водорода клеток *C. reinhardtii*, иммобилизованных на стеклянных волокнах, хотя скорость выделения водорода у свободных и иммобилизованных клеток при этом не отличается. Сообщается, что Das и другие разработано искусственное устройство на основе иммобилизованной на ткани – гидрогели культуры микроводорослей, зажатой между двумя соседними системами каналов предназначенных для доставки питательных веществ (нижний слой) и сбора водорода (верхний слой). Исследователями, таким образом, достигнуты анаэробные условия, высокий показатель производства водорода, полученный в условиях данного устройства было 1 мл/час [149].

Таким образом, при правильном выборе носителя и способа иммобилизации клеток в реальных технологиях, иммобилизация фототрофных микроорганизмов упрощает сбор биомассы, способствует повышению устойчивости культур к стрессовым воздействиям и упрощает разработку аппаратного обеспечения для культивирования цианобактерий с целью получения различных метаболитов, в том числе и биоводорода.

Подводя итоги, хочется отметить, что, не смотря на достигнутый значительный прогресс в изучении различных подходов и стратегий увеличения производства биоводорода клетками цианобактерий, необходимы дальнейшие разработки новых фотобиореакторов позволяющих повысить концентрацию клеток и тем самым увеличить продукцию водорода. Водородные топлива могут быть использованы в различных типах топливных элементов как чистая энергия для того чтобы произвести электричество с высокой эффективностью.

В целом, технологическая цепочка производства биоводорода с помощью цианобактерий может быть представлена из следующих узлов: а) культивирование цианобактерий в биореакторе, б) концентрирование и получение биомассы цианобактерий, в) анаэробное культивирование цианобактерий в $H_2$ фотобиореакторе (в темноте либо на свету), г) получение водорода и его очистка от примесей других газов,

д) хранение водородного газа в газгольдере, е) преобразование газообразного водорода в электроэнергию (Рисунок 19).

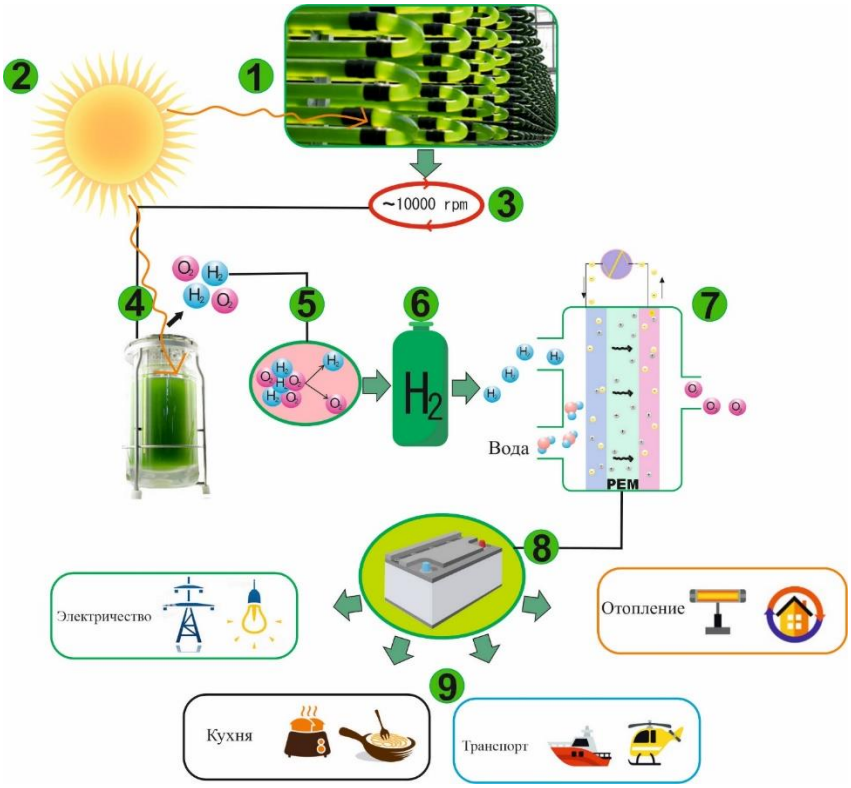



Рис. 19. Основные этапы получения биоводорода из цианобактерий. 1 – выращивание клеток цианобактерий в промышленном фотобиореакторе; 2, используя солнечную энергию для фотосинтеза; 3, получение клеточной биомассы в центрифуге при ~10000 об/мин; 4, использование биомассы для производства водорода в промышленном фотобиореакторе; 5, очистка газообразного водорода от газовой смеси с использованием катализаторов или мембран; 6 - хранилище водорода; 7, производство электроэнергии с использованием PEM; 8, батарея; 9, применение водородной энергии.

Преобразование газообразного водорода в электроэнергию возможно благодаря тому, что водородный топливный элемент работает по механизму, который можно рассматривать как обратный электролиз воды, при котором водород и кислород объединяются, образуя воду, и в результате процесса создается электрический ток. Ячейка состоит из двух электродных поверхностей, разделенных протонообменной мембраной (PEM). Водород поступает в топливный элемент с одной стороны, у «анода», и сталкивается с каталитической поверхностью, где он распадается на протоны и электроны. Мембрана проницаема только для протонов, а электроны направляются к «катоду» через внешнюю цепь, генерируя электрический ток. С другой стороны мембраны кислород поступает в клетку и в сочетании с протонами и электронами образует воду $2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$ + энергия.

### 2.6. Тенденции и перспективы развития производства биоводорода на основе цианобактерий

#### 2.6.1. Политические меры, определяющие развитие биоводородной энергетики

В связи с тем, что многие развивающиеся страны в равной мере озабочены своей зависимостью от импортируемых источников энергии целью энергетической политики многих стран является снижение зависимости от неустойчивости цен на различные источники энергии и нарушений их поставок. При этом, постоянные скачки цен главным образом на нефть, еще больше укрепляют стимул выявлять и поддерживать использование альтернативных источников энергии для транспорта, обогрева и генерации электроэнергии. Поэтому, в настоящее время во многих странах мира проводят политику, стимулирующую производство биологического топлива. Активный спрос со стороны быстрорастущих развивающихся стран усиливает обеспокоенность в отношении будущих цен на энергию и энергоснабжение. Таким образом, энергия, получаемая из биологического топлива, рассматривается как один из способов изменения источников энергии и снижения зависимости от ограниченного числа экспортеров. В числе этих источников энергии биоводород, как практически

неиссякаемый, возобновляемый источник энергии, занимает активную позицию и участвует в процессе закладывания будущей модели энергетической системы мира. Так, несмотря на то, что водородная экономика остается пока делом отдаленного будущего, водородные технологии для энергетики, такие как водородное аккумулирование энергии возобновляемых источников, водородные накопители для автономной и распределенной генерации, заправки для постоянно растущего количественно и качественно водородного транспорта, активно внедряются в экономику развитых стран.

Вторым важным фактором, который определяет политику в отношении биоэнергии, является растущее осознание воздействия ископаемого топлива на глобальное изменение климата. Всем известна необходимость принятия мер, направленных на сокращение выбросов парниковых газов, и многие страны поддерживают использование энергии, полученной из альтернативных возобновляемых биологических источников, рассматривая это как ключевой элемент своей деятельности по смягчению последствий изменения климата.

Немаловажным моментом развития биоэнергетики является также стремление снизить уровень загрязненности воздуха в городах. Использование биоводорода предполагает значительное сокращение токсичных выбросов в атмосферу по сравнению с использованием ископаемого топлива в сферах производства электроэнергии, обогрева и транспорта.

Все вышеизложенное предопределяет влияние различных аспектов политики на рентабельность производства биоводорода в целом во многих секторах, в том числе в сельском хозяйстве, энергетике, транспорте, экологии и торговле. Установление надлежащей политики и количественное определение ее воздействия в конкретных случаях осложняется по причине многообразия инструментов политики и способов их применения, однако во многих случаях это субсидии, направленные на поддержку биоэнергетики и воздействующие на финансовую привлекательность его производства, торговли и применения.

Однако необходимо отметить, что развитие современных тенденций мирового рынка любого биологического топлива

сопровождается развитием противоречий субъектов на всех уровнях - от государства до отдельных хозяйствующих структур и потребителей, при котором экономические, экологические и социальные эффекты от внедрения биологического топлива остаются предметом обширных споров. В случае получения биоводорода клетками цианобактерий, несмотря на имеющиеся перспективы фотобиологического производства водорода их клетками, все же необходимо отметить существование трудностей, тормозящих его получение и использование в широком масштабе. Уровень производства биоводорода цианобактериями в настоящее время недостаточен для его коммерческого производства в качестве конкурентоспособного энергоносителя, поэтому его производство на современном этапе развития науки и техники в большинстве стран мира будет иметь более высокую себестоимость по сравнению с традиционным топливом.

Ключевой проблемой является низкая способность цианобактерий к продукции водорода. Данный фактор может стать существенным препятствием развития фотобиологического получения водорода как топлива, и, следовательно, требуют углубленного анализа процессов повышения водородной продуктивности цианобактериями и правильного на это распределения субсидий и инвестиций.

Так, первым делом должны быть предприняты меры стимулирования производства биоэнергии, разработаны и внедрены комплексные программы развития биотехнологий, существенную роль в которых играет биоэнергетика. Несомненно, для развития данного сектора биоэнергетики потребуется довольно много времени, тем не менее, как полагают многие аналитики, развитие водородной энергетики может удовлетворить нарастающие потребности населения мира в топливе, наряду с обеспечением экологической безопасности.

В связи с этим, в случае получения биоводорода клетками цианобактерий основные субсидии и инвестиции в настоящее время должны быть выделены в первую очередь на их фундаментальные научные исследования. Так для успешного производства водорода на основе цианобактерий, необходимо изучить дополнительные аспекты улучшения продуцентов

вышеизложенными генетическими и метаболическими подходами. При этом развитие генной инженерии, высокопроизводительных технологий и достижения системной биологии с применением общей геномных инструментов, позволяют получить штаммы цианобактерий с желаемым генотипом и необходимой производительностью водорода. Внедрение и развитие синтетической биологии позволяют индивидуально сконструировать клетки цианобактерий с необходимыми реакциями, определяющими их в качестве конкурентоспособных продуцентов биоводорода.

Помимо этого субсидии и инвестиции должны быть распределены на развитие инфраструктуры для хранения, транспортировки, масштабирования технологии получения и использования биоводорода, при этом немалая доля инвестиций должно быть выделена на высокоэффективные процессы доочистки полученного водорода, все это требует крупных инвестиций в оборудование и в современные передовые технологии. Такая политическая поддержка необходима поскольку как известно, получение биоводорода и расширение рынка его использования не произойдут до того, пока не появится достаточная инфраструктура распределения и торговых точек.

Кроме этого, необходимо внедрение передовых технологий повышения эффективности производства биоводорода, снижения его себестоимости, для чего также необходимо выделение устойчивых инвестиции. В целом создание технологической и технической базы для развития данного сектора биоэнергетики, внедрение современных инженерных разработок и производство необходимого оборудования, а также финансирование региональных проектов в области производства энергии и тепла из биоводорода требует больших капиталовложений и политической поддержки государства.

### 2.6.2. Технико-экономический анализ получения биоводорода цианобактериями

Внедрение любых новых биоэнергетических технологий требует технико-экономического анализа выгодности данной инновации, оценки затрат на инвестиционный проект и его

результатов, анализа срока окупаемости проекта. При этом, технико-экономическое обоснование предполагает изучение степени эффективности и качества используемого ресурса и возможные пути оптимизации процесса для повышения производительности предлагаемой технологии. В целом водородная энергетика во многих странах относится к приоритетным направлениям социально-экономического развития и находит все большую поддержку со стороны как государства, так и частного бизнеса. При этом ведется активный поиск путей перевода большинства энергоемких отраслей промышленности, включая транспорт, на водородное топливо и электрохимические генераторы на основе использования топливных элементов.

К настоящему времени опубликован ряд обзоров [138,141], посвященных сравнительному анализу основных методов получения водорода, в том числе оценке технико-экономического обоснования целого ряда способов производства водорода, начиная от традиционных, таких как электролиз воды и конверсия углеводородов, и кончая биологическими методами выделения водорода. В данном разделе статьи мы не будем подробно останавливаться на описании процессов всех известных способов производства водорода, а лишь проведем краткий сравнительный анализ технико-экономических аспектов некоторых из них, с определением преимуществ и недостатков рассматриваемого нами подхода получения водорода на основе цианобактерий с уже функционирующими промышленными способами его производства.

Как известно, существуют много различных технологий производства водорода, которые отличаются между собой источниками используемого сырья и основными процессами получения газа. В целом все эти подходы получения водорода можно объединить в три большие группы основываясь на происходящие там процессы.

Из различных видов органического топлива: природный газ, уголь, древесина и т.п. а также из различных органических отходов и биомассы в процессах паровой конверсии, газификации и пиролиза;

Из воды методами электролиза или термохимического разложения;

Из воды, питательных веществ и энергии солнечного света за счет жизнедеятельности микроорганизмов (цианобактерий, водоросли).

Известно, что в мире промышленным способом производится около 60 млн.т. водорода, 95% которого получают из ископаемого углеродосодержащего сырья традиционными методами как паровая конверсия газа, газификация угля или нефтяных остатков и электролиз воды.

Так паровой конверсией природного газа можно получить газовую смесь, богатую водородом (70-75% по сухой массе). Являясь эндотермическим процессом, данный способ производства водорода требует дополнительного подвода тепла, а увеличение выхода водорода и очистки его от примесей требуют организации дополнительных мероприятий. В результате при объемах производства 100 т $H_2$ в сутки (4170 кг/ч) эффективность производства водорода может достигать 70-80. Основные удельные расходы в этой технологии производства на 1 кг $H_2$ составляют: природного газа - 5,0-5,5 $м^3$; воды – 4,5 кг; электроэнергии – 63,3 кДж/моль $H_2$. Выбросы $CO_2$ с учетом потерь природного газа при магистральном транспорте и выработке электроэнергии в энергосистеме достигают 0,3–0,4 $м^3$ $CO_2$ на $м^3$ произведенного $H_2$ [17]. Основными недостатками получения водорода термохимическими методами является зависимость от поставок ископаемого углеродосодержащего сырья, запасы которого небезграничны и к тому распределены всего между несколькими регионами. Помимо этого одним из серьезных проблем является выделение в атмосферу больших количеств $CO_2$, утилизация которого в свою очередь требует значительных капитальных затрат и эксплуатационных расходов.

Получение водорода на основе переработки биомассы предполагает термохимическую технологию обработки растительных культур, сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов с образованием смешанного газа, продуктом

переработки которых посредством дальнейшей конверсии является водород. При этом выход водорода при пиролизе биомассы зависит от типа сырья, типа используемого катализатора, температуры и времени пребывания [61, 68]. Стоимость производства водорода при пиролизе биомассы составляет 1,25 - 2,20$/кг $H_2$, в зависимости от размера объекта и типа биомассы [66]. При газификации паром выход водорода значительно выше, и стоимость производства водорода составит 1,77–2,05 $/кг на 139-700 кг в день с удельными расходами 2,4 TJ энергии на TJ водорода [70]. Недостатком способа является необходимость методов отделения и очистки водорода от других, одновременно образующихся продуктов, что связано с дополнительными затратами. Кроме того, поскольку это термохимический процесс, данная технология тоже является энергоемкой и также имеет место выделение больших количеств $CO_2$ в атмосферу.

Относительно небольшое количество водорода получают с помощью электролиза. Это достаточно эффективный, широко применяемый в промышленности метод получения водорода. Но несмотря на то, что этот способ производства водорода основан на использовании неисчерпаемого и доступного сырья – воды, а также возможности получения высокой чистоты водорода в конечном продукте, объем водорода получаемый этим методом небольшой и составляет до 5% от общего объема производимого водорода. Стоимость такого водорода зависит от типа электролизера и капитальных затрат, а также от стоимости потребляемой электроэнергии. Известно, что себестоимость водорода полученной этим способом в 3-6 раз выше, чем получение водорода из природного газа [17]. Согласно имеющимся расчетам, для получения 1 кг $H_2$ расходуется около 53 кВ тч электроэнергии при кпд электролизера 75% [71]. Таким образом, основным недостатком метода является высокая стоимость электролитического водорода, кроме того электролиз воды с помощью электроэнергии, произведенной из ископаемого топлива излучает также значительное количество $CO_2$ [71].

Что же касается рассматриваемого нами в данной статье подхода получения водорода на основе цианобактерий методами прямого и непрямого биофотолиза, то в настоящее время, в силу того что это еще теоретический метод, оценить экономические показатели этого метода, сравнивая с уже освоенными на энергетическом рынке методами производства водорода, довольно трудно. Основные затраты и капиталовложения в данном способе необходимы на конструкцию и обслуживание фотобиореакторов для культивирования цианобактерий, на различные инженерные работы по разделению и переработке газов, его хранению и транспортировке.

В целом, данный подход, при решении основных фундаментальных проблем связанных с получением активных продуцентов водорода, можно рассматривать как экономичный и устойчивый метод производства водорода, поскольку в качестве возобновляемого источника используется вода, используется энергия солнечного света, культивирование цианобактерий не требует дорогих питательных сред, и даже предполагает возможности использования сточных вод для их выращивания, что дополнительно значительно удешевляют данную технологию, обеспечивая недорогую выработку энергии с одновременной обработкой отходов. Кроме того, отсутствие эмиссии парниковых газов и снижение загрязнения окружающей среды, позволяет также исключить капитальные затраты на их утилизацию. Согласно данным ряда исследователей получение водорода методом прямого биофотолиза при условии, что общие капитальные затраты на процесс составят 135$/м$^2$, стоимость производства водорода может составить 1,42$/кг $H_2$ [72]. В таблице 5 приведено краткое описание некоторых технических и экономических аспектов вышеизложенных процессов производства водорода.

Таблице 5 – Технические и экономические аспекты некоторых способов производства водорода

| Процесс | Тип | Сырье | Эффектив-ность (%) | Капитальные затраты (млн$) | Стоимость водорода [$/кг] | Литература |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Паровой риформинг | - | Натуральный газ | 74-85 | 226.4 | 2.27 | [147] |
| Пиролиз Биомассы | - | Древесная биомасса | 35-40 | 5.4-3.1 | 2.13 | |
| Биофотолиз | Прямой | Вода +Микро водорослей | 10 | 50$/м$^2$ | 1.13 | |
| | Косвенный | Вода +Микро водорослей | 10 | 135$/м$^2$ | 1.42 | |
| Электролиз | Ядерный | Вода | 40 | - | 4.15-7 | |
| | Солнечная | Вода | 60 | 421-22.1 | 5.10-10.49 | |

В целом себестоимость водорода полученного термохимическими способами значительно дешевле и эффективность выхода водорода значительно выше по сравнению с водородом полученным методом электролиза. Предполагаемая цена водорода, полученного в результате биофотолиза, на начальных этапах конечно же не может быть соизмерима с ценой водорода термохимического происхождения и может быть высокой. Однако в ряде научных исследований отмечено, что с учетом окупаемости всех капитальных затрат, выделенных на научные исследования, оборудование и технологическое обеспечение и расходы на техническое обслуживание, биоводород может заменить ископаемое топливо с высокой экономической целесообразностью.

### 2.6.3. Практическая значимость данного исследования

Оценка современного состояния исследований в области биохимического производства водорода показала, что несмотря на высокую перспективность данной технологии, на сегодняшний день его производство все еще находится на

начальной стадии своего развития в пределах лабораторных, пилотных установок. Основные ограничения препятствующие его промышленному производству связаны в первую очередь с низкой скоростью образования биоводорода цианобактериями и соответственно незначительному выходу $H_2$, что в итоге сильно влияет на его себестоимость. Анализируя публикационную активность за последние 20 лет можно заметить, что несмотря на то, что такая технология получения биоводорода далека от внедрения в практику, все же биохимическое производство водорода клетками водорослей и цианобактерий привлекает внимание многих исследовательских групп по всему миру. При этом особое внимание исследователей уделяется изучению основных процессов фотосинтеза и роли обеих фотосистем в продукции водорода. Раскрытие природы фотосинтеза, умение управлять фотосинтезом предопределяет огромные возможности и перспективы в области искусственного фотосинтеза. Поэтому, исследования естественного фотосинтеза цианобактерий и растений может служить руководством по разработке и проектированию искусственного фотосинтеза, который позволяет напрямую хранить солнечную энергию в виде химического топлива, решая таким образом фундаментальную проблему возобновляемых источников. Таким образом, если удастся добиться практического применения искусственного фотосинтеза, то это станет основанием для новой огромной сферы биоэнергетической индустрии.

В результате проведенного обзора на основе выявления слабых и сильных сторон рассматриваемого способа получения водорода был составлен SWOT-анализ, с определением возможных перспектив и угроз внедрения данной технологии в производство (Таблица 6).

Таблица 6 – SWOT-анализ производства биоводорода на основе цианобактерий

| | |
|---|---|
| **Сильные стороны** | Использует только регенерирующие субстраты: солнце и воду<br>Высокая скорость роста<br>Гибкость к генетическим модификациям<br>Может расти на дешевых солях<br>Независимо от географического положения и погодных условий<br>Прост в обращении |
| **Слабые стороны** | Дорогие материалы для фотобиореактора<br>Зависит от электричества<br>Сложность разделения $H_2$ и $O_2$<br>Сложность технологии хранения газа $H_2$<br>Высокие транспортные расходы |
| **Возможности** | Крупномасштабная разработка мутантов с более высоким выходом $H_2$<br>Необходимость государственных и международных программ высокого уровня<br>Запуск высокоуровневых проектов захвата и хранения $H_2$<br>Предоставление скидок на транспортировку энергии био-$H_2$ |
| **Угрозы** | Высокая стоимость энергии био-$H_2$<br>Отсутствие международной поддержки<br>Низкий спрос на невозобновляемые источники энергии<br>Неспособность выдержать конкуренцию |

В реальности мировая энергетическая промышленность пока игнорирует потенциал биоводорода получаемого биохимическим путем, что в первую очередь связано с имеющимися огромными запасами традиционных источников энергии. Кроме того отсутствие осознанной необходимости перехода на водородную энергетику тормозит правильное распределение инвестиций в этой области, что тоже в свою очередь сказывается на научных достижениях тормозя прогресс генно-инженерных исследований, остро необходимых для

значительного улучшения производительности различных продуцирующих водород микроворганизмов.

В настоящее время очень много исследований посвященных основным биопроцессам образования водорода клетками цианобактерий, ферментному оснащению этих процессов, изучению влияния различных факторов на общий выход водорода, условиям культивирования их штаммов и аппаратному оформлению данного биотехнологического процесса. Тем не менее, необходимо обобщение и систематизация полученных экспериментальных данных, нужен их теоретический анализ, который проложит путь новым подходам в постановке экспериментов и наблюдений, а в последствии принесет пользу и с практической точки зрения. Проведенный обзор объективно обобщает большое количество имеющихся на сегодняшний день научных достижений в области био-водородной энергетики на основе цианобактерий, определяя основные "узловые" точки, требующие целенаправленного исследования с целью получения конкурентоспособной технологии получения водорода на энергетическом рынке. Так, фотобиологическое производство $H_2$ требует увеличение метаболических возможностей продуцентов водорода на основе комплексного подхода.

Обобщая вышесказанное, можно сделать следующие выводы:

На сегодняшний день существуют огромные пробелы в процессах биологического производства $H_2$ для коммерциализации, однако потенциал биоводорода $_{как}$ «чистой энергии» будет и в дальнейшем мотивировать усилия генной инженерии и биоэнергетики в биологической продукции водорода.

Несмотря на имеющиеся в литературе обилие экспериментальных данных посвященных изучению влияния физиологических и биохимических подходов, позволяющих повысить скорость и продолжительность продуцирования $H_2$ цианобактериями, применением различных видов ингибиторов электронного транспорта и ферментов, регулированием внешних факторов, созданием стрессовых условий и т.п., все же метаболические подходы недостаточно эффективны для

увеличения выхода водорода с целью его масштабного производства.

Перспективы развития био-водородной энергетики на основе цианобактерий могут быть улучшены в первую очередь достижениями генной инженерии, конструирование генетических мутантов цианобактерий обладающих большим потенциалом в производстве водорода. На сегодняшний день, все генетические подходы в модификации цианобактерий, направлены на повышение выхода водорода путем подавления, введения новых или сверхэкспрессии имеющихся генов. Так генетические манипуляции с цианобактериями необходимые для устранения следующих основных проблем: 1) присутствие и активность поглощающей гидрогеназы; (2) низкая частота образования гетероцист; 3) конкуренция за восстановители, наличие иных ассимиляционных путей; 4) низкая фотохимическая эффективность светосборных антенн. В целом собранные в обзоре данные направлены прежде всего на понимание механизмов этих процессов. Их понимание позволит исследователям обобщить и упорядочить имеющиеся данные в этой области, наметить себе ключевые направления исследований и более точно строить стратегию генетической модификации мутантов и получить возможность значительно повысить скорость выделения водорода при высокой эффективности преобразования энергии света.

Еще одним важным прорывным моментом во внедрении биохимического производства водорода на основе цианобактерий является разработка соответствующего аппаратурного оформления этого процесса, в частности, конструирование определенных фотобиореакторов. Техническая конструкция фотобиореакторов используемых для культивирования цианобактерий с целью крупномасштабного производства водорода должны принципиально отличаться от ферментеров предназначенных для получения их биомассы. Необходимы конструкции обеспечивающие контролируемое освещение с обеспечением как освещенной поверхности так и темной зоны, с регулируемой гидродинамикой газовой жидкости, необходимые для циклического протекания процессов роста культуры и продукции водорода, если это

касается циркадного механизма контроля выхода водорода. Либо это могут быть системы фотобиореакторов в которых локализация процессов роста культуры цианобактерий и продукции водорода разделены пространственно, в случае когда синтез газа требует использование иных питательных сред и других не менее важных условий культивирования этих фототрофных микроорганизмов. Все это требует инновационного подхода к конструктивному совершенствованию фотобиореакторов необходимых для крупномасштабного производства водорода.

Таким образом получение мутантных штаммов цианобактерий генетическими подходами, с последующим правильно подобранным метаболическим подходом увеличения выхода водорода, а также разработка инновационных методов их культивирования будет способствовать развитию сектора биохимического производства водорода. И под влиянием целенаправленных политических усилий по совершенствованию биоводородных технологий с выделением больших инвестиций и капиталовложений вполне вероятен значительный прогресс в биоводородной энергетике.

Обобщение сделанных выводов представлено графически на рисунке 20.

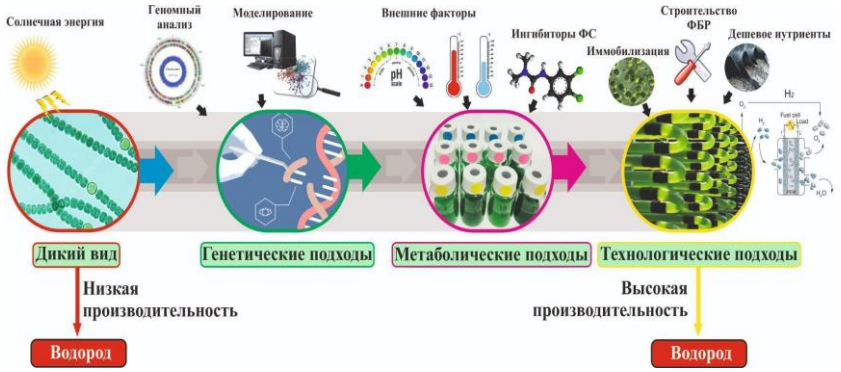



Рис. 20. Основные подходы и факторы, способствующие увеличению выхода $H_2$ клетками цианобактерий

**На сегодняшний день водородная** энергия рассматривается как чистая и альтернативная энергия, которая может быть предложена в качестве энергоносителя будущего. Производство цианобактериального водорода из солнечной энергии является перспективной и сложной биотехнологией, которая играет важную роль в глобальном стремлении сократить выбросы парниковых газов.

Несмотря на космические, энергетические и экологические достоинства биоводорода, основными барьерами в отношении биоводородной экономики являются высокая стоимость сырья, низкая скорость образования биоводорода, незначительный выход $H_2$ из биореактора неэффективные методы его хранения, которые необходимо устранить. Несмотря на то что, в настоящее время получение водородной энергии из цианобактерий, экономически нецелесообразно из-за ее высокой себестоимости, эффективное производство биоводорода из биомассы фототрофных микроорганизмов может быть ускорено благодаря последним технологическим достижениям с метаболическими и генно-инженерными подходами.

Так, согласно проведенному обзору последних исследований в этой области, можно увеличить выход водорода, используя подходящий цианобактериальный штамм, провести адаптацию процесса, улучшить технологические характеристики фотобиореакторов, а также использовать молекулярную инженерию и генетическую технику для изменения метаболического пути продуктивных штаммов.

Несмотря на то что, в настоящее время себестоимость водородной энергии очень высока, чем другие альтернативные виды топлива, в будущем, возможно благодаря научно-исследовательским достижениям, ведущим к улучшению био-водородной технологии, водород будет играть ключевую роль в экономике. Для полного внедрения водородной энергии в качестве энергии будущего необходимы комплексные усилия как ученых, так и инженеров, и возможно использование возобновляемой биомассы для производства водорода может стать решением для преодоления многих экономических ограничений.

### 2.6.4. Методы полчения водорода из фототрофных микроорганизмов

*Способы получения водорода из цианобактерий.* При культивировании видов цианобактерий свет (интенсивность: 45 ммоль фотон/м2/с) передается с трех направлений. Для накопления биомассы культуры культивировали в 70 мл жидкой среды BG-11 и аэрировали с помощью воздухозаборника (рис. 21а). Затем клетки переносят в колбы на 100 мл для подготовки к экстракции $H_2$ (рис. 21а).




А - способ получения биомассы для производства $H_2$; культивирование цианобактерий на водород на свету и в темноте: Б - на свету, В - в темноте, Г - флаконы ГР, приготовленные для двух разных (светлая, темная) фаз

Рис. 21. Способ подготовки штаммов цианобактерий к производству водорода

*Способ подготовки биомассы цианобактерий для производства водорода.* Культуры цианобактерий выращивают в пробирках объемом 40 мл и затем центрифугируют при 10000 об/мин в течение 5 мин. После слива супернатанта к культурам клеток добавляют 100 мл среды BG0-11 и перемешивают в течение 3 мин. Предварительно выращенные клетки доводят до оптической плотности 0,4 с помощью спектрофотометра при длине волны ~ 730 нм (OT730). После этого культуры выращивали на свету в течение 24 часов (интенсивность: 45 ммоль фотон/м2/с) и клетки собирали центрифугированием при 10000 об/мин через 5 минут. После слива супернатанта среды к среде добавляют 30 мл BG0-11. Затем клетки центрифугируют при 10000 об/мин еще 5 мин. После двух промывок клетки, выделенные из супернатанта, измеряют с помощью спектрофотометра OT730-1,5. 7,5 мл среды BG0-11 выливали на концентрированные клетки и модифицировали 50 ммоль HEPES-KOH (pH 7,4) и 100 ммоль NaHCO3 (рис. 22).

Внутри флакона с ГР оставляют 10 мл места для скопления выделяющихся из клеток газов.

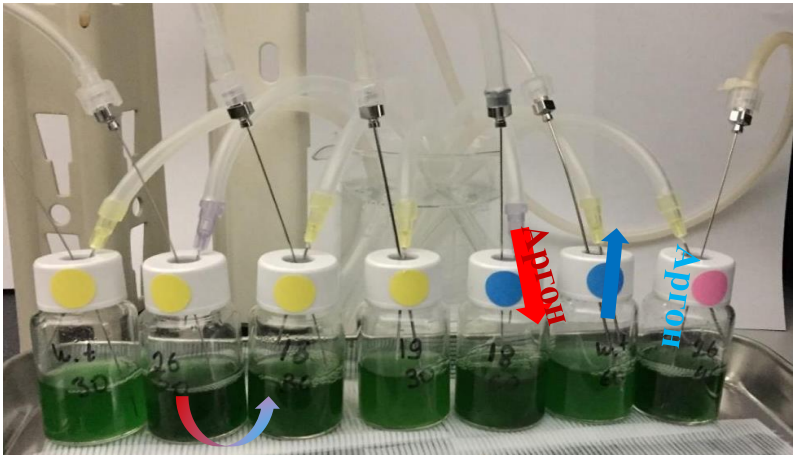



Рис. 22. Создание анаэробных условий введением аргона
в штаммы цианобактерий

Затем аргон вводят во флакон GH с помощью шприца GH для замены кислорода и помещают в светлое или темное место при комнатной температуре. Свет передается с одной стороны флакона ГР и его интенсивность составляет 30 мкмоль фотон/м2/с. Биомассу клеток встряхивают в микромиксере со скоростью 150 об/мин. В темноте виолу GH накрывают фольгой и культивируют в шейкере при температуре 25°C.

*Метод измерения молекулярного водорода.*

Собранный молекулярный газ $H_2$ измеряется в соответствии с инструкциями производителя (рис. 23). Инжектор и колонка работают при 80°C, а детектор при 120°C. С помощью шприца для ГХ отбирают 0,15 мл газа из флакона с ГХ и вводят в ГХ. В ходе опытов температура составляла 25,0 ± 0,5°C, а начальный pH - 7,4.

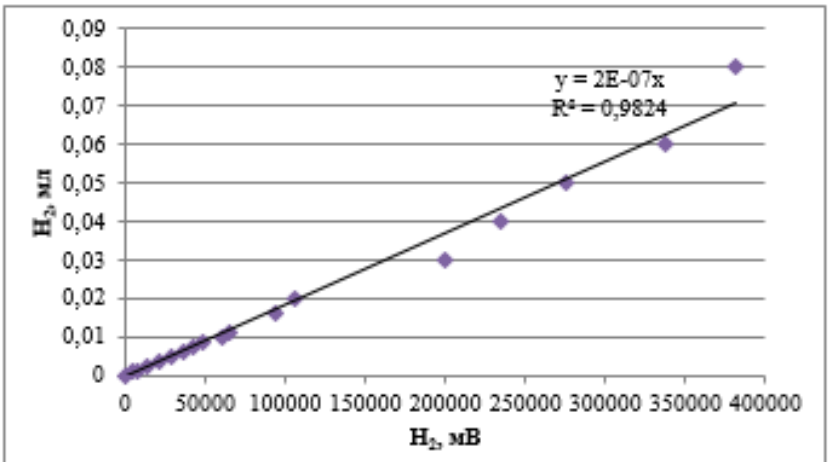



Рис. 23. Стандартная линия водорода

Стандартная кривая, калиброванная по водороду, используется для расчета молей выделившегося водорода (рис. 23). Microsoft Excel (ANOVA) используется для настройки калибра водорода. После нескольких опытов рассчитана линейная зависимость мВ и мл, среднее отклонение равно

0,9824. Результаты преобразованного водорода переводятся в мкмоль и делятся на концентрацию хлорофилла (мг). Затем он умножается на свободное пространство внутри флакона (15 мл), деленное на час выделения водорода, и конечное производство водорода выражается в ммоль $H_2$/мг гл·ч/ч. В качестве газа-носителя используется аргон.

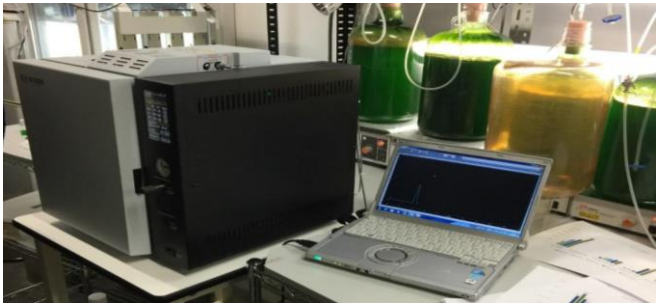


Рис. 24. 3210 газ хроматограф

*Измерение концентрации хлорофилла цианобактерий*

Аликвоту каждого образца по 1 мл собирают в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 5 минут с использованием высокоскоростной микроцентрифуги SS-1500X с охлаждением. После отделения супернатанта культуральной клетке добавляли 1 мл 100%-ного метанола и центрифугировали пробирку при 10000 об/мин в течение 5 мин. Световые спектры 665,2 и 750 нм используют для измерения концентрации хлорофилла a, в качестве контроля получают 100% метанол.

*Способ добавления ингибитора диурона в суспензию цианобактерий.*

Перед формированием анаэробной среды 0,046 г DCMU растворяют в 5 мл диметилфоксида до концентраций 10 ммоль, 30 ммоль и 45 ммоль. Затем GH вводят во флакон с помощью шприца GH в 3 различных концентрациях (рис. 25). После добавления DCMU клеточные культуры встряхивают в течение 30 минут и суспензию перемешивают для включения DCMU [154].

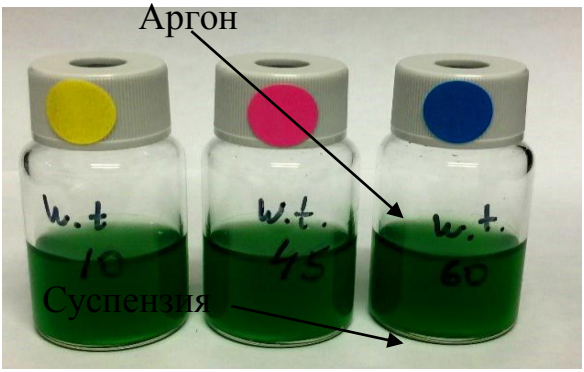



Рис. 25. Флаконы ГХ с разной концентрацией диурона

*Метод измерения нитрогеназной активности ацетиленом*

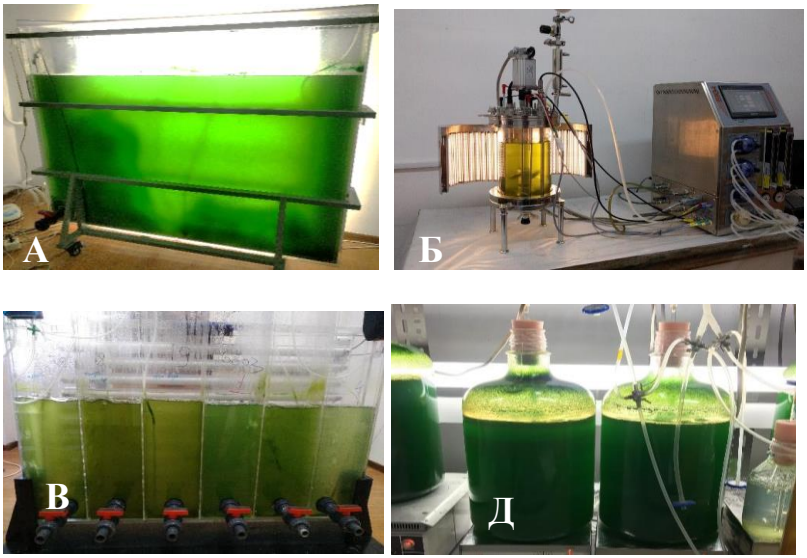
Нитрогеназную активность определяют путем введения в пробирку газовой смеси 10% ацетилен/90% аргон на 30 мин. Клетки во флаконах емкостью 30 мл культивируют в течение 24 часов при интенсивности света 250 мкмоль на фотон $м^2$/сек (рис. 26). После инкубации отбирают пробы газа по 500 мкл и определяют концентрацию этилена в газовой смеси. Окислительно-восстановительную активность ацетилена определяют на газовом хроматографе, рекомендуемую в нмоль этилена/мг биомасса/ч.




Рис. 26. Варианты исследований для определения нитрогеназной активности

*Способ подготовки биомассы цианобактерий к водородной экстракции*

С целью получения большого количества биомассы штаммы гетероцистных цианобактерий интенсивно выращивают в 200-литровом фотобиореакторе при освещении 300-100 мкмоль фотон м2/сек при температуре 25°С с аэрацией. В некоторых случаях для увеличения накопления гетероцист используют среду BG0-11. При оптической плотности 0,6 биомассу клеток собирают центрифугированием при 15 об/мин в течение 15 минут. Оптическую плотность скорости роста клеток измеряют с помощью спектрофотометра при длине волны 720 нм. Готовят оптическую плотность суспензии при 6 различных концентрациях (рис. 27).




Фотобиореактор: А – 200 л; Б – 5 л; В – 12л х 6; Д – 20 л.

Рис. 27. Культивирование цианобактерий

**Список использованных источников**

1. Voloshin RA, Rodionova MV, Zharmukhamedov SK, Veziroglu TN, Allakhverdiev SI. Review: Biofuel production from plant and algal biomass. Int J Hydrogen Energy 2016;41:17257–73.

2. Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. Int J Hydrogen Energy 2001;26:13–28.

3. Smith GD, Ewart GD, Tucker W. Hydrogen production by cyanobacteria. Int J Hydrogen Energy 1992;17:695–8.

4. Manis S, Banerjee R. Comparison of biohydrogen production processes. Int J Hydrogen Energy 2008;33:279–86.

5. Fani R, Gallo R, Lio P. Molecular evolution of nitrogen fixation: The evolutionary history of the *nif*D, *nif*K, *nif*E, and *nif*N genes. J Mol Evol 2000;51.

6. Tamagnini P, Axelsson R, Lindberg P, Oxelfelt F, Wunschiers R, Lindblad P. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. Microbiol and Molec Bio Rev 2002;66:1–20.

7. Datta M, Nikki G, Shah V. Cyanobacterial hydrogen production. World J Microbiol Biotechnol 2000;16:8–9.

8. Khetkorn W, Rastogi R, Incharoensakdi A, Lindblad P, Madamwar D, Pandey A, Larroche C. Microalgal hydrogen production – A review. Bioresource Technology 2017;243:1194–206.

9.] Felseghi RA, Carcadea E, Raboaca MS, Trufin CN, Filote C. Hydrogen fuel cell technology for the sustainable future of stationary applications. Energies 2019;12:4593.

10. Tsygankov AA. Azotfiksiruyushchiye tsianobakterii – produtsenty vodovoda (Obzor). Prikl biokhim i mikrobiol 2007;43:279–88.

11. Hallenbeck P. Hydrogen production by cyanobacteria. Chapter in book Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production 2011;15–28.

12. Khetkorn W, Lindblad P, Incharoensakdi A. Enhanced biohydrogen production by the $N_2$-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012. Int J Hydrogen Energy 2010;35:12767–76.

13. Weare NM, Benemann JR. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. Nitrogenase activity during induction and aging of batch cultures. Arch Mikrobiol 1973;93:101–12.

14. Bolatkhan K, Kossalbayev BD, Zayadan BK, Tatsuya Tomo, Veziroglu TN, Allakhverdiev SI. Hydrogen production from phototrophic microorganisms: Reality and perspectives. Int J Hydrogen Energy 2019;44:5799–811.

15. Reith JH, Wijffels RH, Barten H. Bio-methane and Bio-hydrogen. Dutch Biological Hydrogen Foundation 2003;124–45.

16. Peltier G, Tolleter D, Billon E, Cournac L. Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae. Photosynth Res 2010;106:19–31.

17. Oh Y-K, Raj SM, Jung GY, Park S. Metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. Bioresource Technology 2011;102:8357–67.

18. Hankamer B, Lehr F, Rupprecht J, Mussgnug J, Posten C, Kruse O. Photosynthetic biomass and $H_2$ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up. Physiol Plantarum 2007;131:10–21.

19. Horiuchi J, Kikuchi S, Kobayashi M, Kanno T, Shimizu T. Modeling of pH response in continuous anaerobic acidogenesis by an artificial neural network. Biochem Eng J 2001;9:199–204.

20. Nagarajan D, Lee D-J, Kondo A, Chang J-S. Recent insights into biohydrogen production by microalgae – from biophotolysis to dark fermentation. Bioresour Technol 2017;227:373–87.

21. Eroglu E, Melis A. Microalgal hydrogen production research. Int J Hydrogen Energy 2016;41:12772–98.

22. Akkerman I, Janssen M, Rocha J, Wijffels RH. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. Int J Hydrogen Energy 2002;27:1195–208.

23. Carrieri D, Wawrousek K, Eckert C, Yu I, Maness P-J. The role of bidirectional hydrogenases in cyanobacteria. Bioresour Technol 2011;102:8368–77.

24. Srirangan K, Pyne ME, Perry Chou C. Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria. Bioresour Technol 2011;102:8589–604.

25. Baebprasert W, Jantaro S, Khetkorn W, Lindblad P, Incharoensakdi A. Increased $H_2$ production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by redirecting the electron supply *via* genetic engineering of the nitrate assimilation pathway. Metabol Engineer 2011;13:610–6.

26. Ferreira AAE, Cavalcanti JH, Vaz M, Alvarenga VL, Adriano N-N, Araújo W. Cyanobacterial nitrogenases: phylogenetic diversity, regulation and functional predictions. Genetics and Molecular Biology 2017;40.

27. Suzuki I, Horie N, Sugiyama T, Omata T. Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation. J Bacteriol 1995;177:290–6.

28. Thiel T, Lyons EM, Erker JC. Characterization of genes for a second Mo-dependent nitrogenase in the cyano-bacterium *Anabaena variabilis*. J Bacteriol 1997;179:5222–5.

29. Kentemich T, Danneberg G, Hundeshagen B, Bothe H. FEMS Microbiol Lett 1988;51:19–24.

30. Boison G, Steingen C, Stal L, Bothe H. The rice field cyanobacteria *Anabaena azotica* and *Anabaena* sp. CH1 express vanadium-dependent nitrogenase. Archives of microbiology 2006;186:367–76.

31. Masukawa H, Kitashima M, Inoue K, Sakurai H, Hausinger R. Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and water. Ambio 2012;41:169–73.

32. Krahn, E, Schneider K, Müller A. Comparative characterization of $H_2$ production by the conventional Mo nitrogenase and the alternative "iron-only" nitrogenase of *Rhodobacter capsulatus hup*$^-$ mutants. Appl Microbiol Biotechnol 1996;46:285–90.

33. Vignais P. Hydrogenases and $H^+$ reduction in primary energy conservation. Results and problems in cell differentiation 2008;45:223–52.

34. Ghirardi ML, Mohanty P. Oxygenic hydrogen photoproduction –current status of the technology. Current Science 2010;98:499–507.

35. Boison G, Schmitz O, Mikheeva L, Shestakov S, Bothe H. Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. FEBS Lett 1996;394:153–8.

36. Boison G, Bothe H, Schmitz O. Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulan* sand *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR. Curr Microbiol 2000;40:315–32.

37. Houchins JP. The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. Biochim Biophys Acta 1984;768:227–55.

38. Schmitz O, Boison G, Salzmann H, Bothe H, Schutz K, Wang SH, Happe T. HoxE – a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. Biochim Biophys Acta 2002;1554:66–74.

39. Happe T, Schutz K, Bohme H. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. J Bacteriol 2000;182:1624–31.

40. Weyman P, Pratte B, Thiel T. Transcription of hupSL in *Anabaena variabilis* ATCC 29413 is regulated by NtcA and not by hydrogen. Appl and env microbial 2008;74:2103–10.

41. Axelsson R, Lindblad P. Transcriptional regulation of *Nostoc* hydrogenases: effects of oxygen, hydrogen, and nickel. Appl Environ Microbiol 2002;68:444–7.

42. Tatsuhiko Y, Higuchi Y. Studies on hydrogenase. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences 2013;89:16–33.

43. Khetkorn W, Khanna N, Incharoensakdi A, Lindblad P. Metabolic and genetic engineering of cyanobacteria for enhanced hydrogen production. Biofuels 2013;4:535–61.

44. Chow TJ, Tabita FR. Reciprocal light-dark transcriptional control of *nif* and *rbc* expression and light-dependent post translational control of nitrogenase activity in *Synechococcus* sp. strain RF-1. J Bacteriol 1994;176:6281–5.

45. Huang T-C, Chow T-J. Comparative studies of some nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria isolated from rice fields. J Gsn Microbiol 1988;134:3089–97.

46. Troshina O, Serebryakova L, Sheremetieva M, Lindblad P. Production of $H_2$ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. Int J Hydrogen Energy 2002;27:1283–9.

47. Prabaharan D, Arun KD, Uma L, Subramanian G. Dark hydrogen production in nitrogen atmosphere: an approach for sustainability by marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* BDU 20041. Int J Hydrogen Energy 2010;35:10725–30.

48. Min H, Sherman LA. Hydrogen production by the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 under conditions of continuous light. Appl Environ Microbiol 2010;76:4293–301.

49. Schwarz S, Poss Z, Hoffmann D, Appel J. Hydrogenases and hydrogen metabolism in photosynthetic prokaryotes. Advances in Experimental Medicine and Biology 2010;675:305–48.

50. Tsygankov AA, Fedorov AS, Kosourov SN, Rao KK. Hydrogen production by cyanobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions. Biotechnology and Bioengineering 2002;80:777–83.

50. Lindblad P. Cyanobacterial $H_2$ Metabolism: Knowledge and Potential/Strategies for a Photobiotechnological Production of $H_2$. Biotecnol. Apl.1999;16:141–4.

51. Yeager CM, Milliken CE, Bagwell CE, Staples L, Berseth PA, Sessions HT. Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen production among heterocystous cyanobacteria. Int J Hydrogen Energy 2011;36:7487–99.

52. Heyer H, Stal L, Krumbein WE. Simultaneous heterolactic and acetate fermentation in the marine cyanobacterium *Oscillatoria limosa* incubated anaerobically in the dark. Arch Microbiol1989;151:558–64.

53. Prabaharan D, Subramania G. Oxygen-free hydrogen production by the marine cyanobacterium *Phormidium* valderianum BDU 20041. Bioresour Technol 1996;57:111–6.

51. Khetkorn W, Baebprasert W, Lindblad P, Incharoensakdi A. Redirecting the electron flow towards the nitrogenase and bidirectional Hox-hydrogenase by using specific inhibitors results in enhanced $H_2$ production in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012. Bioresource technology 2012;118:265–71.

52. Nyberg M, Heidorn T, Lindblad P. Hydrogen production by the engineered cyanobacterial strain *Nostoc* PCC 7120 Δ*hup*W examined in a flat panel photobioreactor. J Biotechnol 2015;215:35–43.

53. Aoyama K, Uemura I, Miyake J, Asada Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. J Ferment Bioeng 1997;83:17–20.

54. Carrieri D, Ananyev G, Costas AMG, Bryant DA, Dismukes GC. Renewable hydrogen production by cyanobacteria: Nickel requirements for optimal hydrogenase activity. Int J Hydrogen Energy 2008;33:2014–22.

55. Shah V, Gard N, Madamwar D. Ultrastructure of the fresh water cyanobacterium *Anabaena variabilis* SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production. FEMS Microbiol Lett 2001;194:71–5.

56. Neuer G, Bothe H. Electron donation to nitrogenase in heterocysts of cyanobacteria. Arch Microbiol 1985;143:185–91.

57. Yodsang P, Raksajit W, Aro E. Factors affecting photobiological hydrogen production in five filamentous cyanobacteria from Thailand. Photosynthetica 2018;56**:**334–41.

58. Jeffries TW, Timourien H, Ward RL. Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: Effect of varying ammonium and ferric ions, pH and light. App Env Microbiol 1978;35:704–10.

59. Touloupakis E, Rontogiannis G, Benavides AMS, Cicchi B, Ghanotakis DF, Torzillo G. Hydrogen production by immobilized *Synechocystis* sp. PCC 6803. Int J Hydrogen Energy 2016;41:15181–6.

60. Kumazawa T, Sato S, Kanenari D, Kunimatsu A, Hirose R, Matsuba S, Obara H, Suzuki M, Sato M, Onodera J. Precursor of carthamin, a constituent of safflower. Chemistry Letters 1994;2343–4.

61. Yoshino F, Ikeda H, Masukawa H, Sakurai H. High photobiological hydrogen production activity of *Nostoc* sp. PCC 7422 uptake hydrogenase-deficient mutant with high nitrogenase activity. Mar Biotechnol 2007;9:101–12.

62. Weissman JC, Benemann JR. Hydrogen production by nitrogen starved cultures of *Anabaena cylindrica*. Appl Environ Microbiol 1977;33:123–31.

63. Shah V, Garg N, Madamwar D. Ultrastructure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* and exploitation of the culture for hydrogen production. Folia Microbiol 2003;48:65–70.

64. Hihara Y, Sonoike K, Kanehisa M, Ikeuchi M. DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium Synechocystis sp. Strain PCC 6803. J Bacteriology 2003;185:1719–25.

65. Bandyopadhyay A, Stöckel J, Min H, Sherman LA, Pakrasi HB. High rates of photobiological $H_2$ production by a cyanobacterium under aerobic conditions. Nat Commun 2010;139.

66. Zhang ZP, Tay JH, Show KY, Yan R, Liang DT, Lee DJ, Jiang WJ. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. Int J Hydrogen Energy 2007;32:185–91.

67. Fedorov AS, Tsygankov AA, Rao KK, Hall DO. Production of hydrogen by an *Anabaena variabilis* mutant in photobioreactor under aerobic outdoor conditions. In: Miyake J, Matsunaga T, San PA, editors. BioHydrogen II. Oxford, United Kingdom: Elsevier 2001;223–8.

68. Lambert GR, Smith GD. Hydrogen formation by marine Blue-green algae. FEBS Lett 1977;83:159–62.

69. Masukawa H, Nakamura K, Mochimaru M, Sakurai H. Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria. In: Miyake J, Matsunaga T, San PA, editors. BioHydrogen II. Elsevier 2001;63–6.

70. Markov SA, Bazin MJ, Hall DO. Hydrogen photoproduction and carbon dioxide uptake by immobilized *Anabaena variabilis* in a hollow-fiber photobioreactor. Enz Microb Technol 1995;17:306–10.

71. Sveshnikov DA, Sveshnikova NV, Rao KK, Hall DO. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress. FEBS Microbiol Lett 1997;147:297–301.

72. Famiglietti M, Hochkoeppler A, Luisi PL. Surfactant-induced hydrogen production in cyanobacteria. Biotechnol Bioeng 1993;42:1014–8.

73. Howarth DC, Codd GA. The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria. J Gen Microbiol 1985;131:1561–9.

74. Taikhao S, Phunpruch S. Increasing hydrogen production efficiency of $N_2$-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 by cell immobilization. Energy Procedia 2017;138:366–71.

75. Serebryakova LT, Sheremetieva ME, Lindblad P. $H_2$-uptake and evolution in the unicellular cyanobacterium *Chroococcidiopsis thermalis* CALU 758. Plant Physiol Biochem 2000;38:525–30.

76. Oost VJ, Bulthuis BA, Feitz S, Krab K, Kraayenhof R. Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7822. Arch Microbiol 1989;152:415–19.

77. Kufryk G. Advances in utilizing cyanobacteria for hydrogen production. Advances in Microbiology 2013;3:60–8.

78. Kossalbayev BD, Tatsuya Tomo, Zayadan BK, Sadvakasova AK, Bolatkhan K, Allakhverdiev SI. Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production. Int J Hydrogen Energy 2020;45:2627–39.

79. Antal TK, Lindblad P. Production of $H_2$ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. J Appl Microbiol 2005;98:114–20.

80. Moezelaar R, Bijvank SM, Stal LJ. Fermentation and sulfur reduction in the mat-building cyanobacterium *Microcoleus chtonoplastes*. Appl Environ Microbiol 1996;62:1752–8.

81. Heyer H, Stal L, Krumbein WE. Simultaneous heterolactic and acetate fermentation in the marine cyanobacterium *Oscillatoria limosa* incubated anaerobically in the dark. Arch Microbiol 1989;151:558–64.

82. Phlips EJ, Mitsui A. Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7. Appl Environ Microbiol 1983;45:1212–20.

83. Kumazawa T, Sato S, Kanenari D, Kunimatsu A, Hirose R, Matsuba S, Obara H, Suzuki M, Sato M, Onodera J. Precursor of carthamin, a constituent of safflower. Chemistry Letters 1994;2343–4.

84. Prabaharan D, Subramania G. Oxygen-free hydrogen production by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 20041. Bioresource Technology 1996;57:111–6.

85. Cheng J, Xia A, Song W, Su H, Zhou J, Cen K. Comparison between heterofermentation and autofermentation in hydrogen production from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* wet biomass. Int J Hydrogen Energy 2012;37:6536–44.

86. Hasnaoui S, André Pauss, Nadia Abdi, Hocine Grib, Nabil Mameri. Enhancement of bio-hydrogen generation by spirulina via an electrochemical photo-bioreactor (EPBR), Int J Hydrogen Energy 2020;45:6231–42.

87. Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. J Bacteriol 2004;186:1737–46.

88. Gutthann F, Egert M, Marques A, Appel J. Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogen evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochim Biophys Acta-Bioenergetics 2007;1767:161–9.

89. Burrows EH, Chaplen FWR, Ely RL. Optimization of media nutrient composition for increased photofermentative hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803. Int J Hydrogen Energy 2008;33:6092–9.

90. Ekman M, Ow SY, Holmqvist M, Zhang X, van Wagenen J, Wright PC, Stensjö K. Metabolic adaptations in a $H_2$ producing heterocyst-forming cyanobacterium: potentials and implications for biological engineering. J Proteome Res 2011;10:1772–84.

91. Thomas J, Timourian H, Ward RL. Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: effects of varying ammonium and ferric ions, pH, and light. Appl env microbiol 1978;35:704–10.

92. Skizim NJ, Ananyev GM, Krishnan A, Dismukes GC. Metabolic pathways for photobiological hydrogen production by nitrogenase- and hydrogenase-containing unicellular cyanobacteria *Cyanothece*. J Biological Chemistry 2011;287:2777–86.

93. Dutta D, De D, Chaudhuri S, Bhattacharya S. Hydrogen production by cyanobacteria. Microbial cell factories 2005;4.

94. Lewandowska M, Sirko A. Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. Acta Biochimica Polonica 2008;55:457–71.

95. Wykoff D, Davies J, Melis A, Grossman A. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant physiology 1998;117:129–39.

96. Bernat G, Waschewski N, Rögner M. Towards efficient hydrogen production: the impact of antenna size and external factors on electron transport dynamics in *Synechocystis* PCC 6803. Photosynth Res 2009;99:205–16.

98. Spiller H, Ernst A, Kerfin W, Böger P. Increase and stabilization of photoproduction of hydrogen in *Nostoc muscorum* by photosynthetic electron transport inhibitors. Zeitschrift für Naturforschung C 1978;33:541–7.

99. Meunier PC, Burnap RL, Sherman LA. Interaction of the photosynthetic and respiratory electron transport chains producing slow $O_2$ signals under flashing light in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Photosynthesis Research 1995;45:31–40.

100. Pansook S, Incharoensakdi A, Phunpruch S. Effects of the Photosystem II inhibitors CCCP and DCMU on hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. Sci World J 2019;10. ID1030236.

102. Abdelwahab HEM. Hydrogen production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 with engineered subunit of the bidirectional $H_2$-ase. Adv in Life Sci Technol 2014;18:7–19.

103. Peschek GA, Obinger C, Paumann-Page M. The respiratory chain of blue-green algae (Cyanobacteria). Physiologia plantarum 2004;120:358–69.

104. Allen MM, Turnburke AC, Lagace EA, Steinback KE. Effects of Photosystem II herbicides on the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. Plant physiology 1983;71:388–92.

105. Foster CE, Krämer T, Wait AF, Parkin A, Jennings DP, Happe T, McGrady JE, Armstrong FA. Inhibition of [FeFe]-hydrogenases by formaldehyd e and wider mechanistic implications for biohydrogen activation. J Am Chem Soc 2012;134:7553–57.

106. Torimura M, Miki A, Wadano A, Kano K, Ikeda T. Electrochemical investigation of cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942-catalyzed photoreduction of exogenous quinones and photoelectrochemical oxidation of water. J Electroanalytical Chemistry 2001;496:21–8.

107. Appel J, Phunpruch S, Schulz R. The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. Arch Microbiol 2000;173:333–8.

108. Berg SP, Krogmann DW. Mechanism of KCN inhibition of photosystem I. J Biol Chem 1975;10:8957–62.

109. Trubitsin BV, Ptushenko VV, Koksharova OA, Mamedov MD, Vitukhnovskaya LA, Grigor'ev IA, Semenov AY, Tikhonov AN. EPR study of electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Oxygen-dependent interrelations between photosynthetic and respiratory electron transport chains. Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics 2005;170:8238–49.

110. Vargas SR, Santos PV, Zaiat M, Calijuri MC. Optimization of biomass and hydrogen production by *Anabaena* sp. (UTEX 1448) in nitrogen-deprived cultures. Biomass Bioenergy 2018;111:70–6.

111. Leino H, Shunmugam S, Isojarvi J, Oliveira P, Mulo P, Saari L, Battchikova N, Sivonen K, Lindblad P, Aro E-M, Allahverdiyeva Y. Characterization of ten $H_2$ producing cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. Int J Hydrogen Energy 2014;39:8983–91.

112. Margheri MC, Tredici MR, Allotta G, Vagnoli L. Heterotrophic metabolism and regulation of uptake hydrogenase activity in symbiotic cyanobacteria. *In*: Developments in plant and soil sciences – biological nitrogen fixation.M. Polsinelli, R. Materassi and M. Vincenzini (ed.) Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands. 1990;481–486.

113. Allahverdiyeva Y, Leino H, Saari L, Fewer DP, Shunmugam S, Sivonen K, Aro E-M. Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. Int J Hydrogen Energy 2010;35:1117–27.

114. Cheng J, Li H, Zhang J, Ding L, Ye Q, Lin R. Enhanced dark hydrogen fermentation of *Enterobacter* aerogenes/HoxEFUYH with carbon cloth. Int J Hydrogen Energy 2019;44:3560–8.

115. Munekage YN, Taniguchi YY. Promotion of cyclic electron transport around Photosystem I with the development of C4 photosynthesis. Plant Cell Physiol 2016;57:897–903.

116. Shikanai T. Cyclic electron transport around Photosystem I: genetic approaches. Plant Biol 2007;58:199–217.

117. Courteille A, Vesa S, Sanz-Barrio R, Cazalé A-C, Becuwe-Linka N, Farran I, Havaux M, Rey P, Rumeau D. Thioredoxin m4 controls photosynthetic alternative electron pathways in *Arabidopsis*. Plant Physiol 2013;161:508–20.

118. Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T. *PGR5* Is involved in cyclic electron flow around Photosystem I and is essential for Photoprotection in *Arabidopsis.* Cell 2002;110:361–71.

119. Kosourov S, Seibert M, Ghirardi ML. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, $H_2$-producing Chlamydomonas reinhardtii cultures. Plant Cell Physiol 2003;44:146–55.

120. Shestakov SV, Mikheeva LE. Genetic control of hydrogen metabolism in cyanobacteria. Russian J Genetics 2006;42:1272–84.

121. Kars G, Gunduz U, Rákhely G, Yücel M, Eroglu I, Kovacs K. Improved hydrogen production by uptake hydrogenase deficient mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. Int J Hydrogen Energy 2008;33:3056–60.

122. Lindberg P, Schütz K, Happe T, Lindblad P. A hydrogen-producing, hydrogenase-free mutant strain of *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. Int J Hydrogen Energy 2002;27:1291–6.

123. Tsygankov AA, Khusnutdinova AN. Uchastiye Ng v metabolizme purpurnykh bakteriy i perspektivy prakticheskogo ispol'zovaniya. Mikrobiologiya 2015;84:3–26.

124. Zdybiewska MW, Kula B. Removal of ammonia nitrogen by the precipitation method, on the example of some selected wastewaters. Wat Sci and Technol 1991;24:229–34.

125. Golden JW, Yoon H-S. Heterocyst development in *Anabaena*. Curr Opinion in Microbiol 2003;6:557–63.

126. Buikema WJ, Haselkorn R. Expression of the *Anabaena hetR* gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions. Proceed Nat Acad Sci 2001;98:2729–34.

127. Black LK, Maier RJ. Sequences and characterization of *hupU* and *hupV* genes of *Bradyrhizobium japonicum* encoding a possible nickel-sensing complex involved in the hydrogenase expression. J Bacteriol 1994;176:7102–6.

128. Benemann JR, Weare NM. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. Hydrogen-supported nitrogenase activity. Arch Mikrobiol 1974;101:401–8.

129. Weyman PD, Vargas WA, Tong Y, Yu J, Maness P-C, Smith HO, Xu Q. Heterologous expression of *Alteromonas macleodii* and *Thiocapsa roseopersicina* [NiFe] hydrogenases in *Synechococcus elongatus*. PLoS One 2011;6.

130. McNeely K, Xu Y, Ananyev G, Bennette N, Bryant DA, Dismukes GC. *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 *nifJ* mutant lacking pyruvate: ferredoxin oxidoreductase. Appl Environ Microbiol 2011;77:2435–44.

131. Jin HF, Lim BR, Lee K. Influence of nitrate feeding on carbon dioxide fixation by microalgae. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 2006;41:2813–24.

132. Kosourov S, Murukesan G, Seibert M, Allahverdiyeva Y. Evaluation of light energy to $H_2$ energy conversion efficiency in thin films of cyanobacteria and green alga under photoautotrophic conditions. Algal Research 2017;28:253–63.

133. Oncel SS, Kose A, Faraloni C, Imamoglu E, Elibol M, Torzillo G, Sukan FV. Biohydrogen production using mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*: the effects of light intensity and illumination patterns. Biochem Eng J 2014;92:47–52.

134. Tsygankov AA, Fedorov AS, Kosourov SN, Rao KK. Hydrogen production by cyanobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions. Biotechnology and Bioengineering 2002;80:777–83.

135. Borodin VB, Tsygankov AA, Rao KK, Hall DO. Hydrogen production by *Anabaena variabilis* PK84 under simulated outdoor conditions. Biotechnol Bioeng 2000;69:478–85.

135. Duman G, Uddin MA, Yanik J. Hydrogen production from algal biomass via steam gasification. Bioresour Technol 2014;166:24–30.

136. Koroneos C, Dompros a, Roumbas G. Hydrogen production via biomass gasification – a life cycle assessment approach. Chem Eng Process Process Intensif 2008;47(8):1267–74.

137. Zhou L. Progress and problems in hydrogen storage methods. Renew Sustain Energy Rev 2005;9(4):395–408.

138. Sharma A, Arya SK. Hydrogen from algal biomass: A review of production process, Biotechnol Reports 2017;15:63–9.

139. Staffell I, Scamman D, Abad AV, Balcombe P, Dodds PE, Ekins P, Shahd N, Warda KR. The role of hydrogen and fuel cells in the global energy system. Energy Environ Sci 2019;12:463–91.

140. Leino H, Kosourov SN, Saari L, Sivonen K, Tsygankov AA, Aro E-M, Allahverdiyeva Y. Extended $H_2$ photoproduction by N2-fixing cyanobacteria immobilized in thin alginate films. Int J Hydrog Energy 2012;37:151–61.

141. Liao Q, Zhong N, Zhu X, Huang Y, Chen R Enhancement of hydrogen production by optimization of biofilm growth in a photobioreactor. Int J Hydrogen Energy 2015;40:4741–51.

142. Mansson A, Johansson B, Nilsson LJ. Assessing energy security: An overview of commonly used methodologies. Energy 2014; 73:1–14.

144. Juan B, Àlex M-M, Javier G, Yolanda R, Albert G. Bioelectrochemical hydrogen production from urban wastewater on a pilot scale. Journal of Power Sources 2017;356:500–9.

145. Prakash P, Sheeba N. Hydrogen production from steam gasification of biomass: Influence of process parameters on hydrogen yield – A review. Renewable Energy 2014;66:570–79.

146. Sheehan J. Projected Benefits of Federal Energy Efficiency and Renewable Energy Programs - FY 2007 Budget Request (GPRA 2007). NREL 2006:344.
http://www.nrel.gov/docs/fy05osti/37931.pdf

147. Nikolaidis P, Poullikkas A. A comparative overview of hydrogen production processes. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2017;67:597–611.

148. Giannelli L, Torzillo G. Hydrogen production with the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* grown in a compact tubular photobioreactor immersed in a scattering light nanoparticle suspension. Int J Hydrogen Energy 2012;37:16951–61.

149. Das A, Esfahani M, Velev O, Pamme N, Paunov V. Artificial leaf device for hydrogen generation from immobilised *C. reinhardtii* microalgae. J Materials Chemistry A 2015;3:20698–707.

150. Kondo T, Wakayama T, Miyake J. Efficient hydrogen production using a multi-layered photobioreactor and a

photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment. Int J Hydrogen Energy 2006;31:1522–6.

151. Chen CY, Lee CM, Chang JS. Feasibility study on bioreactor strategies for enhanced photohydrogen production from *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5 using optical-fiber-assisted illumination systems. Int J Hydrog Energy 2006;31:2345–55.

152. Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JS. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. Bioresour Technol 2011;102:71–81.

153. Chen CY, Lu WB, Liu CH, Chang JS. Improved phototrophic $H_2$ production with *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates. Bioresour Technol 2008;99:3609–16.

154. Huesemann MH, Hausmann TS, Carter BM, GersChler JJ, Benemann JR. Hydrogen generation through indirect biophotolysis in batch cultures of the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Appl Biochem Biotechnol 2010;162:208–20.

# 3. ПОЛУЧЕНИЕ СПИРТОВЫХ ТОПЛИВ НА ОСНОВЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Энергетический кризис в мировой экономике вызвал высокий спрос на разработку альтернативных традиционным ископаемым видам топлива источников энергии. Наряду с ядерной, солнечной и ветровой энергетикой одной из таких альтернатив является производство биотоплива из растений, цианобактерий или эукариотических микроводорослей. Микроводорослевые биоперерабатывающие заводы с недавних пор стали потенциально экономически жизнеспособным вариантом для совместного производства продуктов с добавленной стоимостью и топлива, таких как биодизельное топливо и биобутанол. В то время как производство биодизеля из микроводорослей широко изучено и изучается, микроводорослевому биобутанолу уделялось меньше внимания из-за низкого выхода продукта биохимического процесса, из которого получают биобутанол: Ацетон-бутанол-этанол (АБЭ) ферментация. Биобутанол является одним из таких мощных видов биотоплива, обладающим теми же характеристиками, что и бензин, что проявляется в более легком общественном распределении на основе существующей нефтегазовой инфраструктуры. Помимо этого, разработка и производство биотоплива третьего поколения, получаемого из культивирования микроводорослей, представляется весьма многообещающей перспективой для возобновляемых источников энергии. Это происходит главным образом из-за присущих ему преимуществ по сравнению с предыдущими методами производства биотоплива из сельскохозяйственных культур и растительных отходов. Однако, несмотря на продолжающиеся исследования, направленные на производство биобутанола с использованием ресурсов микроводорослей, недостаточно. Решение данного обеспечило бы столь необходимый импульс для процветающей индустрии биотоплива, что в конечном итоге поможет справиться с глобальным спросом на энергию и сократить выбросы $CO_2$. В этой статье рассмотрены последние исследования по синтезу бутанола для производства биотоплива различными

биотехнологическими и химическими способами; также обсуждается сравнительный анализ биобутанола по сравнению с биодизельным топливом, а также стратегии производства биобутанола, липидов и метана.

Производство микроводорослевого биотоплива в настоящее время ограничено высокими затратами и энергией, необходимыми во-первых для массового выращивания биомассы микроводорослей и во вторых для последующего ее сбора, что приводит к неконкурентоспособным ценам на биотопливо. Конкурентоспособным способом максимизации окупаемости биотоплива третьего поколения является внедрение микроводорослевых биоперерабатывающих заводов, где производство биотоплива, а также любые другие химические вещества с добавленной стоимостью используются в полной мере [1-3]. Концепция биоочистки дает большое количество возможностей, учитывая, что химический состав микроводорослей богат основными соединениями на основе углерода, которые служат сырьевыми прекурсорами для широкого спектра продуктов, используемых в медицине и биоэнергетике[4]. Но перед запуском данного производства, прежде чем микроводорослевые биоочистные установки станут коммерчески успешными, необходимо оценить и оптимально интегрировать все возможные сценарии преобразования биопереработки и/или переоценки отходов [5].

В последние годы внимание исследователей все больше акцентируется на использовании микроводорослевой биомассы для производства спиртовых биотоплив – этанола и бутанола, как наиболее реальных биотоплив, представляющих большие перспективы в биоэнергетике в качестве альтернативы бензину [4-6]. Этанол в настоящее время является наиболее распространенным возобновляемым биотопливом, получаемым путем ферментации пищевых крахмалов или лигноцеллюлозы бактериями рода *Clostridium* и *Zymomonas mobilis*, дрожжами Saccharomyces cerevisiae. Не смотря на то, что среди всех биотоплив этанол является самым многотоннажным продуктом на сегодняшний день, после сопоставления всего комплекса свойств биобутанола и биоэтанола в качестве компонентов моторных топлив, специалисты выявили значительные

преимущества бутанола. В промышленных масштабах его получают из пропилена или ацетальдегида с помощью различных схем химического синтеза. Получение биобутанола микробиологическим синтезом в большинстве случаев основано на ферментации углеводного сырья растительного происхождения (кукуруза, свекла), имеющего пищевое значение, а также различные отходы деревообрабатывающей продукции, что сказывается на себестоимости конечного продукта, вследствие различных технических проблем, связанных с предобработкой сырья и использования сырьевой базы из культурных растений, имеющих в первую очередь продовольственное значение [7,8]. Для производства спиртовых биотоплив микроводоросли в качестве сырьевой базы, обладают большим потенциалом, поскольку накапливают различные необходимые углеводы. Биомасса красных водорослей может деполимеризоваться в различные мономерные сахара, такие как глюкоза и галактоза. Помимо маннита и глюкозы, бурые водоросли содержат около 14% дополнительных углеводов в виде альгината [8].

Abdo и другие [7] сообщили о наличии альгината, ламинарина, маннита, фукоидана и целлюлозы в некоторых бурых водорослях, которые являются хорошим источником сахаров. Зеленые водоросли запасают углеводы в виде крахмала – амилозы. Некоторыми авторами исследованы зеленые водоросли (*Dunaliella, Ulva lactuca)*, другими бурые водоросли рода *Laminaria*, также тестирован вид *Gracilaria spp.* из отдела *Rhodophyta*. Так сообщалось, что из биомассы галофильной микроводоросли *Dunaliella* штаммом C. pasteurianum получено приблизительно 14,0–16,0 г/л смешанного растворителя, включая бутанол [9]. Имеется опыт использования в качестве субстрата для синтеза бутанола предварительно обработанной биомассы водорослей *Nannochloropsis sp.* и *Arthrospira platensis* [8]. Существуют различные микро- и макроводоросли, такие как *Chlorococcum* sp., *Prymnesium parvum, Gelidium amansii, Gracilaria* sp., *Laminaria* sp., *Sargassum* sp. и *Spirogyra* sp., которые использовались для производства биоэтанола. Не мало важным моментом является то, что для получения бутанола можно использовать не только биомассу микроводорослей, но и

ее отходы, получаемые, например, после выделения липидов при производстве биодизеля.

Одной из основных проблем получения любого вида биотоплива на основе микроводорослей (в том числе цианобактерии) является не достаточно высокий выход конечного продукта, на решение чего направлены разрабатываемые исследователями различные стратегии.

Недостаточно высокий выход конечного продукта – бутанола или этанола при использовании микроводорослевого сырья решается исследователями различными подходами, в том числе оптимизацией среды для ферментации. Так добавлением углеродного субстрата (уксусной и масляной кислот) являющихся основными предшественниками во второй фазе ABE ферментации, был значительно повышен выход бутанола [4]. Значительное увеличение синтеза бутанола до 4,48 г/л (почти в 30 раз) из биомассы красных водорослей было опосредовано масляной кислотой, при котором максимальный выход редуцирующих сахаров в присутствии бутирата составил 0,35 г/г [2].

Безусловно, значительный прогресс в этом вопросе вносит генная инженерия. Методами генной инженерии решаются не только возможности чрезмерного накопления углеводов клетками фототрофных микроорганизмов для получения ценного сырья [3], но и вопросы получения штаммов микроводорослей - продуцентов спирта. Так, для перенаправления и оптимизации метаболического потока углерода сконструирован штамм цианобактерии Synechocystis sp. PCC 6803 с сверхэкспрессией гетерологичных генов, кодирующих пируватдекарбоксилазу Zymomonas mobilis (PDC) и Escherichia coli NADPH-зависимую алкогольдегидрогеназу (YqhD). Идентифицированы специфические гены и определены пути устойчивости этого штамма к спирту для улучшения производства биотоплива. Эффективность образования этанола штаммом Synechocystis sp. PCC 6803 при этом составила -248 мг л-1 день-1, что позволяет рассматривать данный штамм как ценную биосистему для фотосинтетического производства этанола [7].

В целом, многие микроводоросли имеют ферментативный путь метаболизма до этанола, но, безусловно для производство этанола с фотоавтотрофным метаболизмом необходимо внести

изменения в регуляторных путях или создание новых метаболических путей. Такие возможности могут быть реализованы поскольку в их клетках присутсвуют промежуточные продукты, предшественники спиртов. Так, часть 2-кетобутирата, используемого клеткой для синтеза аминокислот можно перенаправить на производство изобутанола.

Зеленая одноклеточная микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii,* является удобным модельным объектом для генетических манипуляций с целью усиленного накопления углеводов для производства этанола посредством ферментации. В трансформированных мутантных штаммах *C. reinhardtii* sta7-10 (c5) и sta7-10 (c19) наблюдалось повышенное накопление крахмала [8]. Приводятся сведения, что для улучшения извлечения ферментируемых углеводов в водорослях, в геном C. reinhardtii был трансформирован ген амилазы гипертермофильной бактерии Thermotoga neapolitana, что позволяет сократить дополнительные процессы предварительной обработки и таким образом облегчит использование биомассы для производства биоэтанола или биобутанола [9].

Таким образом, прежде чем производство биобутанола (будь то из микроводорослей или из любого другого сырья) станет экономически жизнеспособной альтернативой наиболее распространенному биоэтанолу, низкие выходы брожения АБЭ должны быть повышены.

Ферментация АБЭ осуществляется некоторыми видами клостридий в две стадии: ацидогенез и сольвентогенез. На стадии ацидогенеза богатая углеводами биомасса сначала трансформируется в органические кислоты, что вызывает начало сольвентогенной фазы, где накопленные кислоты превращаются в конечные продукты АБЭ [10]. Было предложено корректирование состава питательной среды для ферментации, включающее себя добавление уксусной кислоты и масляной кислоты, в качестве стратегий повышения выхода бутанола при условии, что предварительно определен оптимальный состав [11].

Для оценки потенциала производства биобутанола в рамках микроводорослевой биоочистки, эта работа была направлена на количественную оценку производства микроводорослевого

бутанола посредством ферментации АБЭ. Анализ связанные с производством биобутанола включали:

- определение оптимального состава ферментационной среды с учетом начальных концентраций уксусной кислоты, масляной кислоты и азота с помощью экспериментов на основе глюкозы;
- последующую оценку биомассы микроводорослей в качестве ферментационного субстрата в сырой или гидролизованной форме.

О микробиологическом производстве бутанола впервые сообщил Луи Пастер в 1861 году. Однако только в начале двадцатого века началось широкомасштабное применение спорообразующих анаэробных бактерий из рода *Clostridium* для производства бутанола в промышленных масштабах [12]. С тех пор многочисленные исследования были сосредоточены на процессе ферментации бутанола [13]. Однако микробиологическое производство бутанола обходилось дороже, чем процессы, основанные на нефтехимии, вплоть до 1960-х годов [14]. Интерес к использованию видов клостридий для ферментации ацетон–бутанол–этанол возродился в 1980-х годах в связи с ростом цен на нефть [15]. Бактерии *Clostridium* spp. способны продуцировать органические соединения, кислоты, спирты и другие растворители путем ферментации широкого спектра углеводов [16]. Однако из сахаролитических и мезофильных видов, способных к образованию бутирата, лишь немногие способны производить бутанол с высоким выходом ферментации: *Clostridium acetobutylicum* и *C. beijerinckii* [17]. Периодическая ферментация бутанола делится на две различные стадии: ацидогенез и сольвентогенез. Бактерии растут экспоненциально на первой фазе ферментации, производя кислоты. Это приводит к снижению pH примерно до 4,5. Ближе к концу ацидогенеза скорость выработки падает, поскольку бактериальные клетки переключают свою метаболическую активность с ацидогенеза на сольвентогенез в ответ на низкий pH [18]. Кислотные продукты индуцируют сольвентогенные ферменты, необходимые для второй стадии [19]. На этой фазе ацетат и бутират расходуются в качестве субстратов для биосинтеза ацетона и бутанола, и рост бактерий

не наблюдается. В свою очередь, органические кислоты действуют как со-субстраты для сольвентогенеза [20]. Основным продуктом этой второй фазы является бутанол, наряду с примесью ацетон и этанол. Присутствие растворителей влияет на текучесть и функции клеточной мембраны [21]. В конце сольвентогенеза концентрация бутанола и других продуктов достигает уровня, который останавливает бактериальный метаболизм [22].

Метаболический путь ацидогенеза и сольвентогенеза начинается с сахаров, которые разлагаются до пирувата. Активность гексокиназы, глюкозо-6-фосфатизомеразы и пируваткиназы была выявлена в различных штаммах *Clostridium* spp. [23]. Использование 1 молекулы гексозы дает 2 молекулы пирувата с чистым образованием по 2 молекул АТФ и НАД [24]. Клостридии, продуцирующие растворители, также могут использовать пентозы по фосфоглюконатному пути, параллельному гликолизу. В общей сложности утилизация 3 молекул пентозы в пируват дает по 5 молекул как АТФ, так и НАДН [25]. Как ясно из этого описания пути, пируват является ключевым соединением в метаболизме *Clostridium* spp. [26]. Характер ферментации в значительной степени зависит от активности трех оксидоредуктаз: [FeFe]-гидрогеназы, ферредоксин-НАДФ$^+$ редуктаза. Восстановленный переносчик электронов - ферредоксин играет важную роль в процессе ферментации. Он отдает электроны либо водороду через гидрогеназу, либо пиридиновым нуклеотидам через Ферредоксин-НАДФ$^+$ редуктаза. Пируват генерирует ацетил-КоА, который может быть дополнительно преобразованные в ацетон, ацетат или $CO_2$ восстановленные продукты [27]

Известно, что бактерии *Clostridium* spp. обладают способностью утилизировать как простые, так и сложные сахара, включая пентозы и гексозы [28]. Для разложения полисахаридов на простые моносахариды клостридии выделяют и используют большое количество внеклеточных ферментов, включая амилазу, сахаразу, глюкозидазу, глюкоамилазу, пуллуланазу и амилопуллуланазу. Эти ферменты позволяют производить бутанол из других углеродных субстратов, таких как кукуруза, сахарная свекла, сахарный тростник, картофель,

тапиока или просо [29]. Благодаря своей сильной амилазной активности бактерии *Clostridium* spp. особенно эффективны при утилизации крахмалистых материалов, не требуя их первоначального гидролиза. Меласса, молочная сыворотка, маниока и топинамбур также используются в качестве источников углерода для производства бутанола [30]. Хотя сахароза и крахмал являются хорошими субстратами для ферментации бутанола, но не выгодно из-за их высокой стоимости. Более того, использование этих культур для получения бутанола синтез может быть спорным из-за конкуренции со спросом на продукты питания [31]. Для получения биобутанола из полимерных сахаридов требуется несколько стадий. При последующей переработке, перед ферментацией бутанолом, предварительно обрабатывают возобновляемую биомассу, состоящую из крахмала или лигноцеллюлозных материалов. Способ предварительной обработки зависит от типа используемой биомассы. В одном исследовании из соевой патоки с использованием штамма *C. beijerinckii* было получено около 8 г/л бутанола с выходом 0,1 г/г субстрата [32]. В другом исследовании, которое при использовании упаковочного арахиса на основе крахмала для непрерывного производства бутанола из 80,0 г/л субстрата в течение 110 ч было получено 18,9 г/л бутанола [33]. Сообщается, что периодическая ферментация крахмала маниоки и гидролизата стружки маниоки привела к 16,4-16,9 г/л бутанола с выходом 0,26-0,35 г/г субстрата [34]. В последнее время ферментация рисовых отрубей с использованием Было также обнаружено, что *C. saccharoperbutylacetonicum* дает удовлетворительные результаты при 7,7 г/л бутанол получают с выходом 0,27 г/г общего сахара. В другом исследовании бутанол был получен из предварительно обработанных обезжиренных рисовых отрубей с максимальным выходом 6,48 г/л. Было обнаружено, что клетки *C. acetobutylicum* способны расти в суспензии 10% экструдированных свежих бытовых отходов, производя 3 г/л бутанола. Выход ферментации может быть увеличен до 4,2 г/л путем добавления целлюлаз и β-глюкозидаз. Свежие и высушенные бытовые отходы могут быть обработаны экструзией, после чего общее содержание сахара обычно

составляет от 28% до 39,3%, при этом глюкоза составляет 18,4-25,1% из свежих и высушенных отходов, соответственно. Биомасса водорослей является еще одним источником сырья для ферментации бутанола. Одним из преимуществ использования автотрофных макроводорослей является то, что они потребляют углекислый газ окружающей среды для роста, тем самым помогая уменьшить глобальное потепление. Полисахариды в клеточных стенках водорослей составляют значительную долю от общего содержания углерода. Некоторые виды водорослей содержат большое количество углеводов и могут служить хорошим субстратом для ферментации бутанола. Например, сообщалось, что штамм *C. pasteurianum* продуцирует приблизительно 14,0-16,0 г/л смешанного растворителя, включая бутанол, из галофильной микроводоросли *Dunaliella* со смесью 40 г/л глицерина. Недавно предварительно обработанная биомасса водорослей из *Arthrospira platensis* и сточных водорослей использовалась в качестве субстрата для синтеза бутанола [35].

Было высказано предположение, что наилучшей стратегией экономичного производства бутанола является использование сахаров, экстрагированных из обработанной целлюлозной биомассы, в качестве субстратов для ферментации. Остатки сельскохозяйственных, промышленных, лесных и древесных отходов состоят из целлюлозы, гемицеллюлозы и пектина [36]. Но для получения сбраживаемых сахаров из этих лигноцеллюлозных материалов требуется физическая, химическая и биологическая предварительная обработка, отдельно или в комбинации [37]. Тем не менее, можно сказать что сельскохозяйственные остатки являются наиболее перспективными лигноцеллюлозными субстратами для синтеза бутанола [38]. Большое количество этого материала, такие как отбракованные цельные фрукты и овощи, зерна, стебли, початки и шелуха, образуемые во время сбора урожая и переработки, что приводит к загрязнению окружающей среды, а также к экономическим затратам. Пищевые продукты, особенно фрукты, овощи и зерновые, выбрасываются впустую на всех этапах производственного процесса из-за их деликатного характера и короткого срока годности, после чего они считаются

непригодными для потребления человеком. Отсутствие координации между производителями и дистрибьюторами продуктов питания приводит к увеличению потерь продовольствия. Согласно последним исследованиям, фермеры теряют от 30% до 40% стоимости своих фруктов и овощей до того, как их продукция попадает к конечному потребителю [39]. Отбракованные фрукты и овощи в основном используются в качестве корма для животных или для компостирования. Добавление 5% (в/в) моркови, капусты или помидоров увеличило максимальные значения общего производства растворителя до 9,96 г/л, 10,49 г/л и 10,65 г/л соответственно по сравнению с контрольным значением 7,43 г/л. В свете литературы, касающейся производства бутанола из различных видов биомассы, исследовательские усилия теперь должны быть сосредоточены на использовании различных форм отходов биомассы, а также на выявлении наиболее эффективных штаммов бактерий для промышленных процессов.

В обычном процессе клостридиальной ферментации выход бутанола составляет 16-17 г/л, который может быть достигнуть с использованием лучших местных бактерий. Поэтому одной из основных целей исследований была разработка штаммов для повышения выхода бутанола. Исследования были сосредоточены на: выборе бактериального штамма, использовании менее дорогих источников углерода для производства бутанола, стратегиях метаболической инженерии, разработке процесса и методах извлечения биобутанола.

Одновременный гидролиз пшеничной соломы до простого сахара и ферментация до бутанола является отличной альтернативой использованию дорогостоящей глюкозы в процессах ферментации бутанола. Эксперты [40] провели тесты по одно- и двухэтапной ферментации для оценки результативности периодического процесса получения бутанола из различных полисахаридных материалов, применяя различные вариации предварительной обработки: ферментация с предварительно обработанной пшеничной соломой; раздельный гидролиз и ферментация пшеничной соломы без удаления отложений; одновременный гидролиз и ферментация пшеничной соломы без перемешивания; одновременный

гидролиз и ферментация пшеничной соломы с добавлением сахара и одновременный гидролиз и ферментация пшеничной соломы с перемешиванием путем удаления газа. Максимальный выход бутанола был получен при использовании последней комбинации. В В гидролизате были выявлены разные моносахариды, а конкретно глюкоза, ксилоза, арабиноза, галактоза и манноза. Однако добавление сахара помогло повысить производительность периодической ферментации. Помимо ингибирования продукта, на ферментацию бутанола могут влиять и другие факторы. К ним относятся ингибирование субстрата, ингибирование концентрации соли, наличие мертвых клеток, низкая активность воды, накопление макромолекул, недостаток питательных веществ и диффузия O2 при добавлении питательных веществ в ферментер [41]. Стоит заметить, что, в то время как сыворотка проникает при высоких концентрациях около 200 г/л, она не подавляет ферментацию бутанола, в то время как глюкоза при концентрациях более 161 г/л оказывает ингибирующее действие [42]. Основными ингибиторами ферментации лигноцеллюлозной биомассы являются соединения, присутствующие в лигноцеллюлозных гидролизатах, такие как соли, фурфурол, гидроксиметилфурфурол, уксусная, феруловая, глюкуроновая, кумаровая кислоты и различные фенольные соединения [43]. Было отмечено, что кумаровая и феруловая кислоты действуют как ингибиторы при концентрации 0,3 г/л. Однако фурфурол и гидроксиметилфурфурол в одинаковой концентрации стимулируют рост бактериальных клеток и тем самым процесс ферментации бутанола [44]. Также, при концентрации 1 г/л модельные фенольные соединения подавляют рост клеток на 64-75%, в то время как производство бутанола полностью ингибируется. Следовательно, детоксикация лигноцеллюлозных гидролизатов необходима для максимального получения бутанола из лигноцеллюлозных гидролизатов [45]. Ингибиторы могут быть успешно удалены путем обработки гидролизата гидроксидом кальция или другие гидроксиды. Ингибиторы могут быть успешно удалены путем обработки гидролизата гидроксидом кальция или другими гидроксидами. Куреши и др. сообщалось, что предварительная обработка щелочной

перекисью значительно улучшен выход бутанола при ферментативном гидролизе пшеничной соломы с использованием *C. beijerinckii* [46].

Обработка гидролизата ячменной соломы известью позволяет увеличить производство бутанола с 4,5 г/л с выходом 0,21 г/г общего сахара до 18,0 г/л с выходом 0,29 г/г общего сахара [50]. Аналогичные результаты были получены с гидролизатами кукурузного стовера и свич-травы. Высокие технологические затраты, связанные с некоторыми видами сырья, токсичность продукта и низкие концентрации продукта - и есть некоторые из проблем, связанные с производством биобутанола. Выявление и решение проблем, связанных с преобразованием лигноцеллюлозной биомассы в биобутанол и оценка ключевых усовершенствований процесса могут способствовать повышению коммерческой эффективности биобутанола [51]. На результативность процессов периодического и периодического брожения может влиять не только присутствие многочисленных ингибиторов брожения, но также необходимость дополнительных и трудоемких этапов: стерилизации биореакторов или повторной инокуляции. Данного вида ограничения можно избежать, используя непрерывные процессы ферментации. Широкораспространенной стратегией непрерывной ферментации является клеточные системы, иммобилизованные клеточные системы и рециркуляция клеток в процессе свободной клеточной ферментации клетки в ферментационном бульоне, свободно перемещаемых благодаря механическому перемешиванию. Это удерживает микробные клетки и питательные вещества во взвешенном состоянии и способствует массообмену. Однако процессы ферментации с использованием иммобилизованных клеток имеют важные преимущества по сравнению с процессами непрерывной ферментации со свободными клетками. К ним относятся увеличение производительности ферментации, возможность непрерывной обработки на стабильных пломбах и более низкие затраты на извлечение и последующую обработку. Иммобилизация устраняет фазу задержки, обеспечивает эффективную непрерывную работу без повторной прививки. Помимо этого

улучшает стабильность клеток и каталитические эффекты биокатализаторов[52]. Иммобилизация применялась в различных биореакторах. Используя биореактор с волокнистым слоем, учение добились значительно более высокого выхода бутанола из кукурузы со штаммом *C. acetobutylicum*, чем можно было бы ожидать при использовании обычных методов непрерывной ферментации. Использование масляной кислоты в качестве со-субстрата сокращало фазу образования кислоты в исходном потоке и увеличивало продолжительность фазы образования растворителя. Наполи и др. использовали процесс непрерывной ферментации в реакторе с уплотненным слоем для производства бутанола [53]. Следует использовать ограничение питательных веществ, чтобы избежать чрезмерного роста клеток в упакованных слоях. Модифицированная и улучшенная версия непрерывной ферментации со свободными клетками – это процесс рециркуляции и прокачки клеток. Этот процесс был исследован в системе непрерывного производства бутанола с высокой плотностью *C. saccharoperbutylacetonicum* [54]. Для рециркуляции клеток мембранный модуль был имплантирован в биореактор. Удаление избыточных бактериальных клеток оптимизировало скорость разбавления и облегчило выделение клеток, что привело к шестикратному увеличению выхода бутанола по сравнению с обычным непрерывная ферментация без рециркуляции клеток. Необходимы дальнейшие исследовательские усилия для расширения масштабов систем непрерывного действия для промышленного производства бутанола [55]. Современные технологии производства биобутанола путем ферментации включают очистку биобутанола. Ученые сравнили дистилляцию с паровой очисткой с использованием ректификационных колонн с ректификационными колоннами с колонной экстракции жидкость-жидкость. Результаты показали, что второй процесс является более эффективным вариантом [56]. Интересная технология флэш-ферментации была использована для получения более высокой производительности при синтезе бутанола. Этот метод также может снизить затраты на дистилляцию. Технология состоит из трех взаимосвязанных блоков: ферментера, системы удержания клеток и вакуумного

испарителя. Используя этот метод, были получены конечные концентрации бутанола более 20 г/л. Экстрактивная ферментация является еще одной многообещающей разработкой, которая может снизить эффект ингибирования бутанола. В этом способе бутанол одновременно получают и селективно удаляют, чтобы сохранить концентрацию бутанола в ферментационной среде низкой [57]. Другие распространенные методы удаления бутанола включают: экстракцию жидкость–жидкость, удаление газа, адсорбцию, перстрацию, обратный осмос и первапорацию [58]. Жидкостно–жидкостная экстракция с использованием экстрагента, содержащего 20% деканола в олеиловом спирте и *C. acetobutylicum* ATCC 4259, усиливает образование бутанола в условиях контролируемого pH [59]. Сам по себе деканол токсичен для микроорганизмов; однако, используемый в смеси с олеиловым спиртом и гербетным спиртом этот экстрагент позволяет увеличить производительность бутанола в 2,5 раза по сравнению с обычными процессами ферментации. Идентификация других нетоксичных соединений или смесей соединений оказывает влияние на улучшение жидкостно-жидкостной экстракции бутанола из ферментационного бульона. Ферментация, интегрированная с отгонкой газа, является привлекательной технологией для крупномасштабного синтеза биобутанола. В новом двухступенчатом процессе отгонки газа, интегрированном с ферментацией ацетон-бутанол-этанол, было получено больше АБЭ с более высокой производительностью бутанола. Это был результат сниженного ингибирования бутанола, вызванного извлечением бутанола. На первой стадии отгонки газа был получен конденсат, содержащий 155,6 г/л бутанола, а после разделения фаз была получена органическая фаза, содержащая 610,8 г/л бутанола. На второй стадии первапорации был получен конденсат с содержанием 441,7 г/л бутанол, который после смешивания с органической фазой при отгонке газа дал 521,3 г/л бутанола [60].

Классический подход к производству бутанола из биоэтанола состоит из трех стадий. Вначале товарный продукт тщательно обезвоживают до получения 100% безводного состояния. Далее он окисляется ацетоном в присутствии

изопропанолата алюминия с образованием ацетальдегида. Высоколетучий ацетальдегид отделяют фракционной дистилляцией. На второй стадии ацетальдегид конденсируют в сильно щелочной среде с получением кротонового альдегида. На завершпающей стадии кротоновый альдегид гидрируют до бутанола путем применения обработки изопропанолом в присутствии титана или изопропанолат алюминия.

Это многоступенчатое превращение можно было бы значительно упростить, используя заимствованную водородную процедуру, также известную как реакция Гербера [85]. Было выявлено что эта катализируемая последовательность реакций очень эффективна для превращения широкого спектра спиртов, но не для этанола. Было выявлено, что дегидрирование этанольного субстрата является трудоемким процессом, так как известно, что конденсация ацетальдегида приводит к образованию смеси высокомолекулярных продуктов и полимерных материалов. Однако, сообщалось, что многостадийный процесс, включающий последовательное окисление биоэтанола с получением ацетальдегида, катализируемую основанием альдольную конденсацию ацетальдегида в кротоновый альдегид и, наконец, гидрирование кротонового альдегида с частично гидрированными промежуточными продуктами на гидроксиапатитовом катализаторе, дает 1-бутанол с конверсией 12% и селективностью 67% [86-91]. В литературе имеется несколько сообщений, описывающих прямую каталитическую димеризацию, приводящую к превращению этанола в 1-бутанол, с использованием стехиометрического или нестехиометрического гидроксиапатита, твердых оснований, некоторых цеолитов, углерода скорлупы кокосового ореха и металлов на носителях, системы на металлических носителях, модифицированные оксидами, например, $CeO_2$, и системы на палладиевых носителях, модифицированные KOH в качестве катализаторов [92-95]. Эти технологии включают двухфазный механизм, который проводится в реакторе с неподвижным слоем с конверсия в диапазоне 10-20% и селективность до 70% только в том случае, когда в качестве исходного материала используется абсолютный этанол. Другой многообещающий каталитический процесс,

используемый для превращения биоэтанола в бутанол, осуществляется в жидкой фазе на твердых катализаторах в мини-реакторе высокого давления. В качестве катализаторов при превращении этанола в бутанол использовались Pt, Au, Ag и Ni, нанесенные на оксид алюминия. В оптимизированных условиях при 250°C была получена конверсия этанола 18% и селективность по бутанолу 60% [96-101].

Фу и др. [102] изучали катализируемое марганцем превращение этанола типа Гербета в бутанол. Этот процесс селективно протекал до бутанола (79%) с конверсией 12,6% этанола в присутствии четко выраженного комплекса марганцевых клещей при 160°C. Это был первый отчет, показывающий полезность катализатора без драгоценных металлов для конверсии этанола в высшие спирты в гомогенной фазе;. Кулкарни и др. [103] подтвердили отличные каталитические свойства марганцевых клещевых комплексов типа для превращения этанола в *n*-бутанол. В обзоре Wu и соавт. [104] приводится подробный список гетерогенных и гомогенных катализаторов, применяемых в процессах валоризации этанола в бутанол, и краткое описание предлагаемых механизмов реакции для этих систем. В частности, каталитические процессы, протекающие в жидкой фазе, представляют огромный интерес для химической промышленности из-за их более низкого потребления энергии и потребления газовых материалов. Эффективное преобразование биоэтанола в бутанол в жидкой фазе остается сложной задачей, несмотря на достигнутый прогресс. Особенно сложной проблемой является отделение продуктов от смесей, полученных на промышленных установках [105, 106]. Одностадийный непрерывный процесс получения бутанола путем каталитической конверсии Биоэтанола в субсверхкритическом состоянии. Жидкости в субсверхкритическом состоянии обладают свойствами, пригодными для многих реакций. Это связано с их более высокой диффузионной способностью, более низкой вязкостью и повышенной растворимостью компонентов реакции, обладающих разнообразными свойствами в сверхкритических средах. Эта совершенно особая фаза для этанола достигается, когда давление и температура повышаются почти до или выше их соответствующих критических точек. [107].

**Список использованных источников**

1. Jacob, Ashwin, B. Ashok, Avinash Alagumalai, Hwai Chyuan Ong, и Phung Le. «Critical review on third generation micro algae biodiesel production and its feasibility as future bioenergy for IC engine applications». *Energy Conversion and Management* 228 (1 ноябрь 2020 г.): 113655. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113655.

2. Maity, Jyoti Prakash, Jochen Bundschuh, Chien-Yen Chen, и Prosun Bhattacharya. «Microalgae for Third Generation Biofuel Production, Mitigation of Greenhouse Gas Emissions and Wastewater Treatment: Present and Future Perspectives – A Mini Review». *Energy* 78, вып. C (2014 г.): 104–13.

3. Maliha, Azra, и Bassam Abu-Hijleh. «A Review on the Current Status and Post-Pandemic Prospects of Third-Generation Biofuels». *Energy Systems*, 16 май 2022 г. https://doi.org/10.1007/s12667-022-00514-7.

4. Liyanaarachchi, Vinoj Chamilka, Malith Premaratne, Thilini U. Ariyadasa, P. H. V. Nimarshana, и Anushree Malik. «Two-Stage Cultivation of Microalgae for Production of High-Value Compounds and Biofuels: A Review». *Algal Research* 57 (1 июль 2021 г.): 102353. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102353.

5. Devi, Alka, Krutika Patil, Anil Kumar, Navindu Gupta, Anushree Malik, и Sunil Pabbi. «Production of Valuable Platform Chemicals through Microalgal Routes Utilizing Waste Streams». *Bioresource Technology Reports* 18 (1 июнь 2022 г.): 101071. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101071.

6. Abomohra, Abdelfatah, и Mostafa Elshobary. «Biodiesel, Bioethanol, and Biobutanol Production from Microalgae», 293–321, 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_13.

7. Abdo, Sayeda M., Entesar Ahmed, Sanaa Abo El-Enin, Guzine El Diwan, K. M. El-Khatib, Gamila H. Ali, и Rawheya A. Salah El Din. «Chapter 29 - Algal Fuel Production by Industry: Process Simulation and Economic Assessment». В *Handbook of Algal Biofuels*, под редакцией Mostafa El-Sheekh и Abd El-Fatah Abomohra, 635–52. Elsevier, 2022. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823764-9.00029-7.

8. Moghazy, Reda M., Sayeda M. Abdo, и Rehab H. Mahmoud. «Chapter 7 - Algal Biomass as a Promising Tool for CO2 Sequestration and Wastewater Bioremediation: An Integration of Green Technology for Different Aspects». В *Handbook of Algal Biofuels*, под редакцией Mostafa El-Sheekh и Abd El-Fatah Abomohra, 149–66. Elsevier, 2022. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823764-9.00015-7.

9. Kolesinska, Beata, Justyna Fraczyk, Michal Binczarski, Magdalena Modelska, Joanna Berlowska, Piotr Dziugan, Hubert Antolak, Zbigniew J. Kaminski, Izabela A. Witonska, и Dorota Kregiel. «Butanol Synthesis Routes for Biofuel Production: Trends and Perspectives». *Materials* 12, вып. 3 (23 январь 2019 г.): 350. https://doi.org/10.3390/ma12030350.

10. Zhao, Xinhe, Stefan Condruz, Jingkui Chen, и Mario Jolicoeur. «A quantitative metabolomics study of high sodium response in Clostridium acetobutylicum ATCC 824 acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation». *Scientific Reports* 6 (20 июнь 2016 г.): 28307. https://doi.org/10.1038/srep28307.

11. Vees, Charlotte Anne, Christian Simon Neuendorf, и Stefan Pflügl. «Towards continuous industrial bioprocessing with solventogenic and acetogenic clostridia: challenges, progress and perspectives». *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 47, вып. 9 (2020 г.): 753–87. https://doi.org/10.1007/s10295-020-02296-2.

12. Xue, Chuang, Youduo Wu, Yang Gu, Weihong Jiang, Hongjun Dong, Yanping Zhang, Chunhua Zhao, и Yin Li. «Biofuels and Bioenergy: Acetone and Butanol». В *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, 3:79–100, 2019. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00152-X.

13. Xin, Fengxue, Wei Yan, Jie Zhou, Hao Wu, Weiliang Dong, Jiangfeng Ma, Wenming Zhang, и Min Jiang. «Exploitation of novel wild type solventogenic strains for butanol production». Biotechnology for Biofuels 11 (18 сентябрь 2018 г.): 252. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1252-3.

14. Gong, Fuyu, Guanhui Bao, Chunhua Zhao, Yanping Zhang, Yin Li, и Hongjun Dong. «Fermentation and Genomic Analysis of Acetone-Uncoupled Butanol Production by Clostridium Tetanomorphum». *Applied Microbiology and Biotechnology* 100,

вып. 3 (февраль 2016 г.): 1523–29. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7121-0.

15. Jang, Yu-Sin, Alok Malaviya, и Sang Yup Lee. «Acetone-butanol-ethanol production with high productivity using Clostridium acetobutylicum BKM19». *Biotechnology and bioengineering* 110 (1 июнь 2013 г.). https://doi.org/10.1002/bit.24843.

16. Kim, Sarah Danielle, Xiao Zhu, Yutong Jin, Thuy Nikki Nguyen, Kate Johnston, Annie Li, Xiang Zhang, Jun Zhao, и Kesen Ma*. «Differential Solvent Production by Clostridium Beijerinckii NRRL-B593 Grown on Carbohydrates and Peptides». *Advances in Biochemistry and Biotechnology*, 29 июль 2019 г. https://www.gavinpublishers.com/article/view/differential-solvent-production-by-clostridium-beijerinckii-nrrl-b593-grown-on-carbohydrates-and-peptides.

17. Bramono, Sandhi, Yuen Lam, Say-Leong Ong, и Jianzhong He. «A mesophilic Clostridium species that produces butanol from monosaccharides and hydrogen from polysaccharides». *Bioresource technology* 102 (27 июль 2011 г.): 9558–63. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.077.

18. Paredes, Iván, Julián Quintero, Karlo Guerrero, Roberto Gallardo, Silvia Mau, Raúl Conejeros, Juan Carlos Gentina, и German Aroca. «Kinetics of ABE Fermentation Considering the Different Phenotypes Present in a Batch Culture of Clostridium Beijerinckii NCIMB-8052». *Electronic Journal of Biotechnology* 56 (1 март 2022 г.): 12–21. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.12.002.

19. Li, Shubo, Li Huang, Chengzhu Ke, Zongwen Pang, и Liming Liu. «Pathway dissection, regulation, engineering and application: lessons learned from biobutanol production by solventogenic clostridia». *Biotechnology for Biofuels* 13, вып. 1 (6 март 2020 г.): 39. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01674-3.

20. Nanda, Sonil, Dasantila Golemi-Kotra, John C. McDermott, Ajay K. Dalai, Iskender Gökalp, и Janusz A. Kozinski. «Fermentative Production of Butanol: Perspectives on Synthetic Biology». *New Biotechnology* 37 (25 июль 2017 г.): 210–21. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.02.006.

21. Ezeji, Thaddeus, Caroline Milne, Nathan D. Price, и Hans P. Blaschek. «Achievements and Perspectives to Overcome the Poor Solvent Resistance in Acetone and Butanol-Producing

Microorganisms». *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, вып. 6 (февраль 2010 г.): 1697–1712. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2390-0.

22. Plaza, A., G. Merlet, A. Hasanoglu, M. Isaacs, J. Sanchez, и J. Romero. «Separation of Butanol from ABE Mixtures by Sweep Gas Pervaporation Using a Supported Gelled Ionic Liquid Membrane: Analysis of Transport Phenomena and Selectivity». *Journal of Membrane Science* 444 (1 октябрь 2013 г.): 201–12. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.04.034.

23. Das, Mahua R., Arup K. Bag, Shekhar Saha, Alok Ghosh, Sumit K. Dey, Provas Das, Chitra Mandal, и др. «Molecular Association of Glucose-6-Phosphate Isomerase and Pyruvate Kinase M2 with Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Cancer Cells». *BMC Cancer* 16 (24 февраль 2016 г.): 152. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2172-x.

24. Fermo, Elisa, Cristina Vercellati, Anna Paola Marcello, Anna Zaninoni, Selin Aytac, Mualla Cetin, Ilaria Capolsini, и др. «Clinical and Molecular Spectrum of Glucose-6-Phosphate Isomerase Deficiency. Report of 12 New Cases». *Frontiers in Physiology* 10 (7 май 2019 г.): 467. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00467.

25. Koendjbiharie, Jeroen G., Shuen Hon, Martin Pabst, Robert Hooftman, David M. Stevenson, Jingxuan Cui, Daniel Amador-Noguez, Lee R. Lynd, Daniel G. Olson, и Richard van Kranenburg. «The Pentose Phosphate Pathway of Cellulolytic Clostridia Relies on 6-Phosphofructokinase Instead of Transaldolase». *Journal of Biological Chemistry* 295, вып. 7 (14 февраль 2020 г.): 1867–78. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011239.

26. Wan, Ni, Ashik Sathish, Le You, Yinjie J. Tang, и Zhiyou Wen. «Deciphering Clostridium Metabolism and Its Responses to Bioreactor Mass Transfer during Syngas Fermentation». *Scientific Reports* 7, вып. 1 (30 август 2017 г.): 10090. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10312-2.

27. Sellés Vidal, Lara, Ciarán L. Kelly, Paweł M. Mordaka, и John T. Heap. «Review of NAD(P)H-Dependent Oxidoreductases: Properties, Engineering and Application». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1866, вып. 2 (1 февраль 2018 г.): 327–47. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.11.005.

28. Lee, Brady D, William A Apel, Linda C DeVeaux, и Peter P Sheridan. «Concurrent metabolism of pentose and hexose sugars by the polyextremophile Alicyclobacillus acidocaldarius». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 44, вып. 10 (1 октябрь 2017 г.): 1443–58. https://doi.org/10.1007/s10295-017-1968-2.

29. Sun, Chongran, Shuangfei Zhang, Fengxue Xin, Sabarathinam Shanmugam, и Yi-Rui Wu. «Genomic comparison of Clostridium species with the potential of utilizing red algal biomass for biobutanol production». *Biotechnology for Biofuels* 11, вып. 1 (15 февраль 2018 г.): 42. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1044-9.

30. Masset, Julien, Magdalena Calusinska, Christopher Hamilton, Serge Hiligsmann, Bernard Joris, Annick Wilmotte, и Philippe Thonart. «Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures ofClostridium spp.» *Biotechnology for Biofuels* 5, вып. 1 (22 май 2012 г.): 35. https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-35.

31. Birgen, Cansu, Peter Dürre, Heinz A. Preisig, и Alexander Wentzel. «Butanol production from lignocellulosic biomass: revisiting fermentation performance indicators with exploratory data analysis». *Biotechnology for Biofuels* 12 (28 июнь 2019 г.): 167. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1508-6.

32. Qureshi, N., A Lolas, и Hans Blaschek. «Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using Clostridium beijerinckii BA101». *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 26 (1 июнь 2001 г.): 290–95. https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000131.

33. Ezeji, Thaddeus, Marisa Groberg, N. Qureshi, и Hans Blaschek. «Continuous Production of Butanol from Starch-Based Packing Peanuts». *Applied biochemistry and biotechnology* 105–108 (1 февраль 2003 г.): 375–82. https://doi.org/10.1385/ABAB:106:1-3:375.

34. Moon, Hyeon Gi, Yu-Sin Jang, Changhee Cho, Joungmin Lee, Robert Binkley, и Sang Yup Lee. «One hundred years of clostridial butanol fermentation». *FEMS Microbiology Letters* 363, вып. 3 (1 февраль 2016 г.): fnw001. https://doi.org/10.1093/femsle/fnw001.

35. Al-Shorgani, Najeeb, Abdualati AL- TABIB, и Mohd Kalil. «Production of Butanol from Acetyl Chloride-treated Deoiled

Rice Bran by Clostridium acetobutylicum YM1». *Bioresources* 12 (26 август 2017 г.): 8505–18. https://doi.org/10.15376/biores.12.4.8505-8518.

36. Guo, Yuan, Yi Liu, Mingdong Guan, Hongchi Tang, Zilong Wang, Lihua Lin, и Hao Pang. «Production of Butanol from Lignocellulosic Biomass: Recent Advances, Challenges, and Prospects». *RSC Advances* 12, вып. 29 (2022 г.): 18848–63. https://doi.org/10.1039/D1RA09396G.

37. Chen, Xue, Hanyin Li, Shaoni Sun, Xuefei Cao, и Runcang Sun. «Co-Production of Oligosaccharides and Fermentable Sugar from Wheat Straw by Hydrothermal Pretreatment Combined with Alkaline Ethanol Extraction». *Industrial Crops and Products* 111 (1 январь 2018 г.): 78–85. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.014.

38. Lin, Xiaoqing, Yao Liu, Xiaojie Zheng, и Nasib Qureshi. «High-Efficient Cellulosic Butanol Production from Deep Eutectic Solvent Pretreated Corn Stover without Detoxification». *Industrial Crops and Products* 162 (1 апрель 2021 г.): 113258. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113258.

39. Sadh, Pardeep Kumar, Surekha Duhan, и Joginder Singh Duhan. «Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review». *Bioresources and Bioprocessing* 5, вып. 1 (2 январь 2018 г.): 1. https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z.

40. Jafari, Yadollah, Hamid Amiri, и Keikhosro Karimi. «Acetone pretreatment for improvement of acetone, butanol, and ethanol production from sweet sorghum bagasse». *Applied Energy* 168 (1 апрель 2016 г.): 216–25. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.01.090.

41. Mariano, Adriano, Caliane Costa, Dejanira Angelis, Francisco Filho, Daniel Atala, Maria Maciel, и Rubens Filho. «Optimisation of a continuous flash fermentation for butanol production using the response surface methodology». *Chemical Engineering Research & Design - CHEM ENG RES DES* 88 (1 май 2010 г.): 562–71. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2009.11.002.

42. Al-Shorgani, Najeeb Kaid Nasser, Abdualati Ibrahim Al-Tabib, Abudukeremu Kadier, Mohd Fauzi Zanil, Kiat Moon Lee, и Mohd Sahaid Kalil. «Continuous Butanol Fermentation of Dilute Acid-Pretreated De-oiled Rice Bran by Clostridium acetobutylicum

YM1». *Scientific Reports* 9 (15 март 2019 г.): 4622. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40840-y.

43. Zha, Ying, Johan A Westerhuis, Bas Muilwijk, Karin M Overkamp, Bernadien M Nijmeijer, Leon Coulier, Age K Smilde, и Peter J Punt. «Identifying inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysates using an exometabolomics approach». *BMC Biotechnology* 14 (21 март 2014 г.): 22. https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-22.

44. Kudahettige-Nilsson, Rasika L., Jonas Helmerius, Robert T. Nilsson, Magnus Sjöblom, David B. Hodge, и Ulrika Rova. «Biobutanol Production by Clostridium Acetobutylicum Using Xylose Recovered from Birch Kraft Black Liquor». Bioresource Technology 176 (1 январь 2015 г.): 71–79. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.012.

45. Cho, Dae Haeng, Yun Lee, Youngsoon Um, Byoung-In Sang, и Yong Hwan Kim. «Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from Clostridium beijerinckii». *Applied microbiology and biotechnology* 83 (1 апрель 2009 г.): 1035–43. https://doi.org/10.1007/s00253-009-1925-8.

46. Qureshi, N., Badal Saha, и Ronald Hector. «Removal of fermentation inhibitors from alkaline peroxide pretreated and enzymatically hydrolyzed wheat straw: Production of butanol from hydrolysate using Clostridium beijerinckii in batch reactors». *Biomass and Bioenergy* 32 (1 декабрь 2008 г.): 1353–58. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.04.009.

47. Jin, Qing, N. Qureshi, Hengjian Wang, и Haibo Huang. «Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation of soluble and hydrolyzed sugars in apple pomace by Clostridium beijerinckii P260». *Fuel* 244 (15 май 2019 г.): 536–44. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.01.177.

48. Ezeji, Thaddeus, N. Qureshi, и Hans Blaschek. «Butanol Production From Agricultural Residues: Impact of Degradation Products on Clostridium beijerinckii Growth and Butanol Fermentation». *Biotechnology and bioengineering* 97 (15 август 2007 г.): 1460–69. https://doi.org/10.1002/bit.21373.

49. Oriez, Vincent, Jérôme Peydecastaing, и Pierre-Yves Pontalier. «Lignocellulosic Biomass Fractionation by Mineral Acids

and Resulting Extract Purification Processes: Conditions, Yields, and Purities». *Molecules* 24, вып. 23 (январь 2019 г.): 4273. https://doi.org/10.3390/molecules24234273.

50. Pang, Zong-Wen, Wei Lu, Hui Zhang, Zheng-Wu Liang, Jing-juan Liang, Liang-Wei Du, Cheng-Jie Duan, и Jia-Xun Feng. «Butanol production employing fed-batch fermentation by Clostridium acetobutylicum GX01 using alkali-pretreated sugarcane bagasse hydrolysed by enzymes from Thermoascus aurantiacus QS 7-2-4». *Bioresource Technology* 212 (1 апрель 2016 г.). https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.013.

51. Baral, Nawa R., Lauren Slutzky, Ajay Shah, Thaddeus C. Ezeji, Katrina Cornish, и Ann Christy. «Acetone-butanol-ethanol fermentation of corn stover: current production methods, economic viability and commercial use». *FEMS Microbiology Letters* 363, вып. 6 (1 март 2016 г.): fnw033. https://doi.org/10.1093/femsle/fnw033.

52. Bangrak, Phoowit, Savitree Limtong, и Muenduen Phisalaphong. «Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-reinforced alginate carriers». *Brazilian Journal of Microbiology* 42, вып. 2 (2011 г.): 676–84. https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200032.

53. Dolejs, Igor, Vladimír Krasňan, Radek Stloukal, Michal Rosenberg, и Martin Rebroš. «Butanol production by immobilised Clostridium acetobutylicum in repeated batch, fed-batch, and continuous modes of fermentation». *Bioresource technology* 169C (24 июль 2014 г.): 723–30. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.039.

54. Lin, Zhangnan, Hongjuan Liu, Jing Wu, Petra Patakova, Barbora Branska, и Jianan Zhang. «Effective continuous acetone–butanol–ethanol production with full utilization of cassava by immobilized symbiotic TSH06». *Biotechnology for Biofuels* 12 (16 сентябрь 2019 г.): 219. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1561-1.

55. Zheng, Jin, Yukihiro Tashiro, Tsuyoshi Yoshida, Ming Gao, Qunhui Wang, и Kenji Sonomoto. «Continuous butanol fermentation from xylose with high cell density by cell recycling system». *Bioresource technology* 129C (28 ноябрь 2012 г.): 360–65. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.066.

56. Sánchez Ramírez, Eduardo, Juan Quiroz-Ramírez, Gabriel Segovia, Salvador Hernandez, и Adrian Bonilla-Petriciolet. «Process Alternatives for Biobutanol Purification: Design and Optimization». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 54 (19 январь 2015 г.): 351–58. https://doi.org/10.1021/ie503975g.

57. Mariano, Adriano, Caliane Costa, Maria Maciel, Francisco Filho, Daniel Atala, Dejanira Angelis, и Rubens Filho. «Dynamics and Control Strategies for a Butanol Fermentation Process». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160 (1 апрель 2010 г.): 2424–48. https://doi.org/10.1007/s12010-009-8754-1.

58. Azimi, Hoda, Jules Thibault, и F. Handan Tezel. «Separation of Butanol Using Pervaporation: A Review of Mass Transfer Models». *Journal of Fluid Flow, Heat and Mass Transfer (JFFHMT)* 5, вып. 4 (11 февраль 2019 г.): 53–82.

59. Evans, Patrick J., и Henry Y. Wang. «Enhancement of Butanol Formation by Clostridium acetobutylicum in the Presence of Decanol-Oleyl Alcohol Mixed Extractants». *Applied and Environmental Microbiology* 54, вып. 7 (июль 1988 г.): 1662–67. https://doi.org/10.1128/aem.54.7.1662-1667.1988.

60. Xue, Chuang, Fangfang Liu, Rick Cui, Jingbo Zhao, Lijie Chen, Jiangang Ren, Fengwu Bai, и Shang-Tian Yang. «A novel in situ gas stripping-pervaporation process integrated with acetone-butanol-ethanol fermentation for hyper n-butanol production». *Biotechnology and bioengineering* 113 (1 июнь 2015 г.). https://doi.org/10.1002/bit.25666.

61. Gu, Qiuya, Chunli Liao, и Xiao-Bin Yu. «Enhancing butanol tolerance and preventing degeneration in Clostridium acetobutylicum by 1-butanol–glycerol storage during long-term preservation». *Biomass and Bioenergy* 69 (1 октябрь 2014 г.): 192–97. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.07.019.

62. Lin, Yun-Long, и Hans Blaschek. «Butanol Production by a Butanol-Tolerant Strain of Clostridium acetobutylicum in Extruded Corn Broth». *Applied and environmental microbiology* 45 (1 апрель 1983 г.): 966–73. https://doi.org/10.1128/AEM.45.3.966-973.1983.

63. Kregiel, Dorota. «A short look at microbial producers of biobutanol: New trends, potentialities and limitations». *Journal on Processing and Energy in Agriculture* 24 (1 октябрь 2020 г.): 100–104. https://doi.org/10.5937/jpea24-29524.

64. Li, Shubo, Li Huang, Chengzhu Ke, Zongwen Pang, и Liming Liu. «Pathway dissection, regulation, engineering and application: lessons learned from biobutanol production by solventogenic clostridia». *Biotechnology for Biofuels* 13 (6 март 2020 г.): 39. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01674-3.

65. Lauer, Ira, Gabriele Philipps, и Stefan Jennewein. «Metabolic engineering of Clostridium ljungdahlii for the production of hexanol and butanol from CO2 and H2». *Microbial Cell Factories* 21, вып. 1 (14 май 2022 г.): 85. https://doi.org/10.1186/s12934-022-01802-8.

66. Cho, Changhee, Yu-Sin Jang, Hyeon Moon, Joungmin Lee, и Sang Yup Lee. «Metabolic engineering of clostridia for the production of chemicals». *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 9 (1 декабрь 2014 г.). https://doi.org/10.1002/bbb.1531.

67. Lütke-Eversloh, Tina, и Hubert Bahl. «Metabolic engineering of Clostridium acetobutylicum: Recent advances to improve butanol production». *Current opinion in biotechnology* 22 (1 март 2011 г.): 634–47. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.011.

68. Swidah, R., O. Ogunlabi, C. M. Grant, и M. P. Ashe. «N-Butanol Production in S. Cerevisiae: Co-Ordinate Use of Endogenous and Exogenous Pathways». *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, вып. 22 (1 ноябрь 2018 г.): 9857–66. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9305-x.

69. Liao, Chen, Seung-Oh Seo, Venhar Celik, Huaiwei Liu, Wentao Kong, Yi Wang, Hans Blaschek, Yong-Su Jin, и Ting Lu. «Integrated, systems metabolic picture of acetone-butanol-ethanol fermentation by Clostridium acetobutylicum». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, вып. 27 (7 июль 2015 г.): 8505–10. https://doi.org/10.1073/pnas.1423143112.

70. Dash, Satyakam, Thomas J. Mueller, Keerthi P. Venkataramanan, Eleftherios T. Papoutsakis, и Costas D. Maranas. «Capturing the response of Clostridium acetobutylicumto chemical stressors using a regulated genome-scale metabolic model». *Biotechnology for Biofuels* 7, вып. 1 (14 октябрь 2014 г.): 144. https://doi.org/10.1186/s13068-014-0144-4.

71. Tian, Liang, Peter M. Conway, Nicholas D. Cervenka, Jingxuan Cui, Marybeth Maloney, Daniel G. Olson, и Lee R. Lynd.

«Metabolic engineering of Clostridium thermocellum for n-butanol production from cellulose». *Biotechnology for Biofuels* 12, вып. 1 (23 июль 2019 г.): 186. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1524-6.

72. Lee, Jin, Yu-Sin Jang, Joungmin Lee, Eleftherios Papoutsakis, и Sang Yup Lee. «Metabolic engineering of Clostridium acetobutylicum M5 for highly selective butanol production». *Biotechnology journal* 4 (1 октябрь 2009 г.): 1432–40. https://doi.org/10.1002/biot.200900142.

73. Lee, Byong H. *Advanced Fermentation and Cell Technology*. John Wiley & Sons, 2021.

74. Jang, Yu-Sin, Jin Young Lee, Joungmin Lee, Jin Hwan Park, Jung Ae Im, Moon-Ho Eom, Julia Lee, и др. «Enhanced Butanol Production Obtained by Reinforcing the Direct Butanol-Forming Route in Clostridium acetobutylicum». *mBio* 3, вып. 5 (23 октябрь 2012 г.): e00314-12. https://doi.org/10.1128/mBio.00314-12.

75. Wu, Di, Qin Wang, Rajeev S. Assary, Linda J. Broadbelt, и Goran Krilov. «A Computational Approach To Design and Evaluate Enzymatic Reaction Pathways: Application to 1-Butanol Production from Pyruvate». *Journal of Chemical Information and Modeling* 51, вып. 7 (25 июль 2011 г.): 1634–47. https://doi.org/10.1021/ci2000659.

76. Wu, Di, Qin Wang, Rajeev S. Assary, Linda J. Broadbelt, и Goran Krilov. «A Computational Approach To Design and Evaluate Enzymatic Reaction Pathways: Application to 1-Butanol Production from Pyruvate». *Journal of Chemical Information and Modeling* 51, вып. 7 (25 июль 2011 г.): 1634–47. https://doi.org/10.1021/ci2000659.

77. Liew, Fungmin Eric, Robert Nogle, Tanus Abdalla, Blake J. Rasor, Christina Canter, Rasmus O. Jensen, Lan Wang, и др. «Carbon-Negative Production of Acetone and Isopropanol by Gas Fermentation at Industrial Pilot Scale». *Nature Biotechnology* 40, вып. 3 (март 2022 г.): 335–44. https://doi.org/10.1038/s41587-021-01195-w.

78. Kim, Sarah Danielle, Xiao Zhu, Yutong Jin, Thuy Nikki Nguyen, Kate Johnston, Annie Li, Xiang Zhang, Jun Zhao, и Kesen Ma*. «Differential Solvent Production by Clostridium Beijerinckii NRRL-B593 Grown on Carbohydrates and Peptides». *Advances in Biochemistry and Biotechnology*, 29 июль 2019 г.

https://www.gavinpublishers.com/article/view/differential-solvent-production-by-clostridium-beijerinckii-nrrl-b593-grown-on-carbohydrates-and-peptides.

79. Keibler, Mark A., Sarah-Maria Fendt, и Gregory Stephanopoulos. «Expanding the Concepts and Tools of Metabolic Engineering to Elucidate Cancer Metabolism». *Biotechnology progress* 28, вып. 6 (2012 г.): 1409–18. https://doi.org/10.1002/btpr.1629.

80. Hanson, Andrew D., Donald R. McCarty, Christopher S. Henry, Xiaochen Xian, Jaya Joshi, Jenelle A. Patterson, Jorge D. García-García, Scott D. Fleischmann, Nathan D. Tivendale, и A. Harvey Millar. «The number of catalytic cycles in an enzyme's lifetime and why it matters to metabolic engineering». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, вып. 13 (30 март 2021 г.): e2023348118. https://doi.org/10.1073/pnas.2023348118.

81. Poehlein, Anja, José David Montoya Solano, Stefanie K. Flitsch, Preben Krabben, Klaus Winzer, Sharon J. Reid, David T. Jones, и др. «Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis». *Biotechnology for Biofuels* 10 (9 март 2017 г.): 58. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0742-z.

82. Lehmann, Dörte, Daniel Hönicke, Armin Ehrenreich, Michael Schmidt, Dirk Weuster-Botz, Hubert Bahl, и Tina Lütke-Eversloh. «Modifying the product pattern of Clostridium acetobutylicum». *Applied microbiology and biotechnology* 94 (14 январь 2012 г.): 743–54. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3852-8.

83. Jiang, Yu, Chongmao Xu, Feng Dong, Yunliu Yang, Weihong Jiang, и Sheng Yang. «Disruption of the Acetoacetate Decarboxylase Gene in Solvent-Producing Clostridium Acetobutylicum Increases the Butanol Ratio». *Metabolic Engineering* 11, вып. 4–5 (сентябрь 2009 г.): 284–91. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.06.002.

84. Nölling, Jörk, Gary Breton, Marina V. Omelchenko, Kira S. Makarova, Qiandong Zeng, Rene Gibson, Hong Mei Lee, и др. «Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium Clostridium acetobutylicum». *Journal of Bacteriology* 183, вып. 16 (август 2001 г.): 4823–38. https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4823-4838.2001.

85. Rao, Ashok, A. Sathiavelu, и S. Mythili. «Genetic Engineering In BioButanol Production And Tolerance». *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59 (1 декабрь 2016 г.). https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150612.

86. Duan, Hailing, Yasuhiro Yamada, и Satoshi Sato. «Future Prospect of the Production of 1,3-Butadiene from Butanediols». *Chemistry Letters* 45, вып. 9 (5 сентябрь 2016 г.): 1036–47. https://doi.org/10.1246/cl.160595.

87. De Bruyn, Mario, Zhuohua Sun, и Katalin Barta. «Chapter Three - The Thousand Faces of Cu-Doped Porous Mixed Oxides (Cu-PMO) in the Conversion of Renewable Resources and Beyond». В *Advances in Inorganic Chemistry*, под редакцией Peter C. Ford и Rudi van Eldik, 77:59–98. Catalysis in Biomass Conversion. Academic Press, 2021. https://doi.org/10.1016/bs.adioch.2020.12.002.

88. Rasmussen, Mathew J., Sean Najmi, Giada Innocenti, Andrew J. Medford, Carsten Sievers, и J. Will Medlin. «Supported Molybdenum Oxides for the Aldol Condensation Reaction of Acetaldehyde». *Journal of Catalysis* 408 (1 апрель 2022 г.): 216–26. https://doi.org/10.1016/j.jcat.2022.03.002.

89. Chakraborty, Sumit, Paige E. Piszel, Cassandra E. Hayes, R. Tom Baker, и William D. Jones. «Highly Selective Formation of n-Butanol from Ethanol through the Guerbet Process: A Tandem Catalytic Approach». *Journal of the American Chemical Society* 137, вып. 45 (18 ноябрь 2015 г.): 14264–67. https://doi.org/10.1021/jacs.5b10257.

90. Wang, Dong, Zhenyu Liu, и Qingya Liu. «Efficient Conversion of Ethanol to 1-Butanol and C 5 –C 9 Alcohols over Calcium Carbide». *RSC Advances* 9, вып. 33 (2019 г.): 18941–48. https://doi.org/10.1039/C9RA02568E.

91. Pomalaza, Guillaume, Paola Arango Ponton, Mickaël Capron, и Franck Dumeignil. «Ethanol-to-Butadiene: The Reaction and Its Catalysts». *Catalysis Science & Technology* 10, вып. 15 (2020 г.): 4860–4911. https://doi.org/10.1039/D0CY00784F.

92. Apuzzo, J., Stefano Cimino, и Luciana Lisi. «Ni or Ru supported on MgO/γ-Al 2 O 3 pellets for the catalytic conversion of ethanol into butanol». *RSC Advances* 8 (16 июль 2018 г.): 25846–55. https://doi.org/10.1039/C8RA04310H.

93. Tsuchida, Takashi, Shuji Sakuma, Tatsuya Takeguchi, и Wataru Ueda. «Direct Synthesis of n-Butanol from Ethanol over Nonstoichiometric Hydroxyapatite». *Industrial & Engineering Chemistry Research - IND ENG CHEM RES* 45 (31 октябрь 2006 г.). https://doi.org/10.1021/ie0606082.

94. Goldemberg, José. «Ethanol for a Sustainable Energy Future». *Science* 315, вып. 5813 (9 февраль 2007 г.): 808–10. https://doi.org/10.1126/science.1137013.

95. Mussatto, Solange I., Giuliano Dragone, Pedro M. R. Guimarães, João Paulo A. Silva, Lívia M. Carneiro, Inês C. Roberto, António Vicente, Lucília Domingues, и José A. Teixeira. «Technological Trends, Global Market, and Challenges of Bio-Ethanol Production». *Biotechnology Advances* 28, вып. 6 (декабрь 2010 г.): 817–30. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001.

96. Cao, Benyi, и Abir Al-Tabbaa. «Reactive MgO-based self-healing slag-cement-bentonite slurry walls». *Cement and Concrete Composites* 131 (29 апрель 2022 г.): 104565. https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2022.104565.

97. Yang, Ke, Zhen Jiang, и Chao Zhang. «One-step Synthesis of n-Butanol from Ethanol Condensation over Alumina-supported Metal Catalysts». *Chinese Chemical Letters* 15 (1 декабрь 2004 г.).

98. Sikarwar, Vineet Singh, Ming Zhao, Paul S. Fennell, Nilay Shah, и Edward J. Anthony. «Progress in Biofuel Production from Gasification». *Progress in Energy and Combustion Science* 61 (1 июль 2017 г.): 189–248. https://doi.org/10.1016/j.pecs.2017.04.001.

99. Choi, Heeyoung, Jeehoon Han, и Jechan Lee. «Renewable Butanol Production via Catalytic Routes». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, вып. 22 (9 ноябрь 2021 г.): 11749. https://doi.org/10.3390/ijerph182211749.

100. Pugazhendhi, Arivalagan, Thangavel Mathimani, Sunita Varjani, Eldon R. Rene, Gopalakrishnan Kumar, Sang-Hyoun Kim, Vinoth Kumar Ponnusamy, и Jeong-Jun Yoon. «Biobutanol as a Promising Liquid Fuel for the Future - Recent Updates and Perspectives». *Fuel* 253 (1 октябрь 2019 г.): 637–46. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.139.

101. Atmanli, Alpaslan, и Nadir Yilmaz. «A Comparative Analysis of N-Butanol/Diesel and 1-Pentanol/Diesel Blends in a

Compression Ignition Engine». *Fuel* 234 (15 декабрь 2018 г.): 161–69. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.07.015.

102. Fu, Shaomin, Zhihui Shao, Yujie Wang, и Qiang Liu. «Manganese-Catalyzed Upgrading of Ethanol into 1-Butanol». *Journal of the American Chemical Society* 139, вып. 34 (30 август 2017 г.): 11941–48. https://doi.org/10.1021/jacs.7b05939.

103. Kulkarni, Naveen, William Brennessel, и William Jones. «Catalytic Upgrading of Ethanol to n-Butanol via Manganese Mediated Guerbet Reaction». *ACS Catalysis* 8 (21 декабрь 2017 г.). https://doi.org/10.1021/acscatal.7b03653.

104. Wu, Xianyuan, Geqian Fang, Yuqin Tong, Dahao Jiang, Zhe Liang, Wenhua Leng, Liu Liu, и др. «Catalytic Upgrading of Ethanol to N-Butanol: Progress in Catalyst Development». *ChemSusChem* 11, вып. 1 (2018 г.): 71–85. https://doi.org/10.1002/cssc.201701590.

105. Xiang, Huan, Ruojia Xin, Natthawan Prasongthum, Paweesuda Natewong, Tawan Sooknoi, Jiawei Wang, Prasert Reubroycharoen, и Xiaolei Fan. «Catalytic Conversion of Bioethanol to Value-Added Chemicals and Fuels: A Review». *Resources Chemicals and Materials* 1, вып. 1 (1 март 2022 г.): 47–68. https://doi.org/10.1016/j.recm.2021.12.002.

106. Jeevan Kumar, S. P., N. S. Sampath Kumar, и Anjani Devi Chintagunta. «Bioethanol Production from Cereal Crops and Lignocelluloses Rich Agro-Residues: Prospects and Challenges». *SN Applied Sciences* 2, вып. 10 (11 сентябрь 2020 г.): 1673. https://doi.org/10.1007/s42452-020-03471-x.

107. Ghaziaskar, Hassan S., и Chunbao (Charles) Xu. «One-Step Continuous Process for the Production of 1-Butanol and 1-Hexanol by Catalytic Conversion of Bio-Ethanol at Its Sub-/Supercritical State». *RSC Advances* 3, вып. 13 (6 март 2013 г.): 4271–80. https://doi.org/10.1039/C3RA00134B.

# 4. МАССОВОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

## 4.1. Физиологические и технологические факторы, влияющие на рост клеток

Массовое культивирование микроводорослей определяет развитие устойчивой индустрии производства экологически чистого и экономически эффективного биотоплива из биомассы. Многие виды микроводорослей показывают потенциал для крупномасштабного культивирования, но имеющийся информации мало для проведения коммерческих испытаний. Для успешного получения топлива из микроводорослей требуется созданий условий для продуцирования большего количества биомассы микроводорослей, чтобы конкурировать с другим сырьем [1-5].

Микроводоросли можно культивировать разными методами и в различных условиях. Им нужен свет как источник энергии для преобразования поглощенной воды и $CO_2$ в биомассу посредством фотосинтеза. Продукты фотосинтеза накапливаются в различных формах, таких как клеточные компоненты или запасные материалы, и составляют от 20 до 50% общей биомассы. Водоросли также нуждаются в азоте и фосфоре в качестве основных питательных веществ, на долю которых приходится 10-20% биомассы водорослей [6-8]. Также необходимыми требованиями для роста являются макроэлементы Na, Mg, Ca и K; микроэлементы, такие как Mo, Mn, B, Co, Fe и Zn.[9-10].

В процессе роста клетки водорослей проходят различные фазы (например экспоненциальную, стационарную, гибель). Разные виды микроводорослей могут различаться по своей потребности в среде для роста. Однако основные требования одинаковы почти для всех видов и включают основные питательные вещества, органический или неорганический источник углерода, азота, фосфора и железа [11].

Одним из наиболее важных параметров при культивировании водорослей является тип используемого биореактора. Оно должно быть разработано в соответствии с видом культуры и целью применения. В больших масштабах

водоросли можно культивировать в открытых прудах (прудах с высокой производительностью). Системы открытого культивирования дешевле, но они легко загрязняются. В других биореакторах есть устройства непрерывного или периодического действия [12-15]. Некоторые виды водорослей очень хорошо растут в гетеротрофной культуре. При коммерческом культивировании микроводоросли могут выращиваться на очистных сооружениях,обеспечивая двойную выгоду- очистку воды и производство биомассы[16-18]. Морская вода также является подходящей альтернативной средой для коммерческого культивирования микроводорослей, позволяя избежать затрат на питательные вещества и повысить производительность липидов и других полезных продуктов биомассы микроводорослей. Использование морской воды вместо пресной для культивирования микроводорослей может снизить производственные затраты. В последнее время системы морских культур привлекают внимание для производства водорослей в коммерческих масштабах благодаря преимуществам смешивания с океанскими волнами,использования растворенных питательных веществ и доступности больших площадей,что приводит к снижению затрат на культуру [19-25].

Чтобы сделать биотехнологию водорослей устойчивой, осуществимой и экономически жизнеспособной, требуется разработать успешные технологии культивирования для целевого производства биомассы. Для осуществимой культуры водорослей выход биомассы должен составлять> 30 г/м$^2$/день, примерно о 40 000 различных видов микроводорослей [26]. Культура микроводорослей зависит от вида и зависит от таких факторов, как доступность питательных веществ (N, P, K и т. д.), температура, pH, соленость, неорганический углерод, кислород, интенсивность света и $CO_2$. Успех культивирования, определяется перемешиванием и смешиванием, шириной и глубиной биореактора, частотой сбора урожая и скоростью разбавления. Ниже приведены важные параметры культуры, которые оказывают большое влияние на общий выход биомассы и биопродуктов микроводорослей [27-36].

### 4.1.1. Свет для культивирования

Влияние света на биохимический структуру фотосинтезирующих водорослей в большей степени контролируется процессом, называемым фотоакклимацией или фотоадаптацией. В данном процессе клетки водорослей претерпевают динамические изменения в клеточном составе, а также происходят изменения ультраструктурных, биофизических и физиологических свойств для усиления фотосинтеза и роста водорослей. Совокупной тенденцией клеточной реакции на уменьшение интенсивности света представляет собой увеличение хлорофилла а и других светоулавливающих пигментов [37]. С другой стороны, ответной реакцией на высокую интенсивность света является уменьшение хлорофилла а и других пигментов, непосредственно участвующих в фотосинтезе, в то время как вторичные каротиноиды (например, зеаксантин, бета-каротин, астаксантин), которые служат фотозащитными агентами, увеличиваются. Эти каротиноиды не редко накапливаются в специальных структурах, таких как пластоглобулины пластид или цитоплазматические липидные тела, тем самым играя свою роль в предотвращении попадания избыточной световой энергии в фотосинтетические механизмы. Накопление каротиноидов, как правило, может быть результатом чередования потоков углерода и азота внутри клеток в стрессовых условиях [38].

Высокая интенсивность света, как правило, ускоряет выработку полисахаридов в клетках водорослей [38,39]. При моделировании системы выращивания водорослей на открытом воздухе или в помещении быстрота роста и продуктивность биомассы прогнозируются как функция света. Интенсивность света варируется внутри культуры, также сокращается по глубине, это необходимо учитывать при моделировании биореактора или системы открытого пруда. Распределение интенсивности света внутри плотности потока фотонов концептуально неравномерно из-за поглощения и рассеяния в культуре, а затухание излучения находится в зависимости от длины волны света, концентрации клеток, геометрии ПТФ и расстояния проникновения света. В

определенных случаях свет может проникать только на несколько миллиметров, когда плотность культуры микроводорослей достигает более 10 г/л [40].

При очень низкой и очень высокой интенсивности света микроводоросли не могут быстро расти. В точке компенсации, где поглощение $CO_2$ при фотосинтезе точно соответствует выбросу $CO_2$ при дыхании, чистый прирост равен нулю [41-43]. Более высокая интенсивность света повышает скорость фотосинтеза до некоторой максимальной точки, после чего она выравнивается до тех пор, пока не уравновесится фотодыханием и фотоингибированием. Таким образом, фотосинтетическая активность выше, чем дыхание, когда фотоингибирование не слишком сильно в зоне сильного освещения, так что чистый рост клеток производится; скорость фотосинтеза понижается с увеличением освещенности. Однако, если интенсивность света выше критического значения, в этой зоне появляется отрицательная скорость роста клеток. Поэтому следует максимально избегать ситуации ингибирования света. Фотоингибирование, которое зависит от светового стресса и от того, как долго микроводоросли подвергаются стрессу, может быть обратимым или необратимым. В зоне слабого освещения фотосинтетическая активность выше дыхания, и наблюдается положительная скорость роста клеток, тем, что увеличивается с увеличением поглощения света [44]. Оптимальная интенсивность света должна быть определена экспериментально в каждом конкретном случае, чтобы максимизировать ассимиляцию $CO_2$ при минимальной скорости фотодыхания и как можно меньшем фотоингибировании [45]. Для фотосинтеза водорослей необходима определенная продолжительность периодов света/темноты. Свет необходим для синтеза АТФ и НАДФН, которые управляют темновыми реакциями фотосинтеза, образующими углеродные скелеты [46]. Существует прямая зависимость между ростом микроводорослей, интенсивностью и продолжительностью света вплоть до точки насыщения [47].

Скорость роста и продуктивность биомассы снижались с уменьшением продолжительности освещения. Огромное количество исследований показали, что 16 часов света и 8 часов

темноты наиболее подходят для роста водорослей [48]. В биореакторах для микроводорослей требуется соответствующая интенсивность и продолжительность света, дабы избежать фотоокисления и ингибирования роста. Соответствующее проникновение и равномерное распределение света требуются, чтобы избежать фотоингибирования, также называемого эффектом самозатенения, при котором водоросли в нижних слоях затеняются от света верхними слоями. Для данной цели отличным выбором являются светодиодные лампы, хотя также можно использовать люминесцентные лампы [49]. Аэрированная культура микроводорослей при интенсивности 12 000 люкс в течение 12 часов дневного света дает больший выход биомассы, тогда как при снижении интенсивности света наблюдается соответственно снижение уровня биомассы. К примеру, *M. aeruginosa* дают максимальную биомассу и продуктивность по углеводам при красном светодиодном свете около 5000 люкс. Рациональня степень интенсивности света для большинства видов микроводорослей составляет около 200 400 мкмоль фотонов/м$^2$/с [50-52]. Фотоингибирование можно предупредить, увеличив интенсивность света или постоянно тщательно перемешивая культуру. Таким образом, влияние света неоспоримо на конечный выход биомассы, а также на синтез и накопление углеводов в клетках водорослей. Интенсивность света 50-90 мкмоль фотонов является оптимальной для большинства видов микроводорослей [53].

### 4.1.2. Температура для культивирования

Уменьшение температуры роста ниже оптимального уровня традиционно повышает степень ненасыщенности липидов в мембранных системах. Повышенная стабильность и текучесть клеточных мембран, особенно тилакоидных мембран (благодаря повышенному содержанию ненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах), являются защитой фотосинтетического механизма от фотоингибирования при низких температурах. Было выявлено, что повышенная регуляция экспрессии генов, кодирующих ациллипидные десатуразы, ответственна за вызванную низкой температурой десатурацию жирных кислот цианобактерий [54]. Судя по

всему, температура в физиологически допустимом диапазоне температур может оказывать более значительное воздействие на относительное содержание в клетках классов липидов или на относительный состав молекулярных частиц. К примеру, у восьми видов морского фитопланктона не было выявлено последовательных тенденций изменения содержания липидов в клетке в зависимости от температуры. Было замечено, что снижение температуры роста ниже оптимального диапазона приводит к повышению уровня выработки ферментов в качестве адаптивного механизма для поддержания темпов фотосинтеза и дыхания. Помимо этого выялено что, низкие температуры вызывают накопление в клетках полиолов и аминокислот или производных аминокислот в качестве совместимых растворенных веществ, что также способствует увеличению чувствительности или устойчивости микроводорослей к охлаждению [55].

Увеличение температуры до оптимального диапазона экспоненциально усиливает скорость роста водорослей, но повышение или понижение температуры выше оптимальной точки приводит к снижению или остановке роста и активности водорослей. Оптимальной температурой для культур микроводорослей являются показатели от 25 °C до 35 °C, и почти все виды цианобактерий могут расти при температуре воды от 13 °C до 40 °C [56]. Понижение показателей скорости роста клеток будет наблюдаться при температуре ниже 14 °C, а при показателях температуры выше 41°C рост клеток будет прекращен. Выращивание культур микроводорослей при условиях несоответствия оптимальных температурным диапазонам приведет к большим потерям биомассы, особенно в системах культивирования на открытом воздухе. Значительные перепады изменения температуры будут наблюдаться во время коммерческого культивирования из-за суточного и сезонного поведения. Температура является главным фактором и требует тщательного мониторинга при крупномасштабном культивировании, так как водоросли чувствительны к любым изменениям температуры [особенно в открытом пруду 57-60].

Низкие температуры воздействуют на фотосинтез, уменьшая активность ассимиляции углерода, в то время

чересчур высокие температуры снижают фотосинтез, происходит инактивирование фотосинтетических белков и нарушение энергетического баланса в клетке. Повышенная температура также оказывает влияние на уменьшение размера клеток и дыхания. Снижение фотосинтеза приводит к уменьшению скорости роста клеток[61]. Важное воздействие температуры на фотосинтез сопряжено со спадом активности рибулозо-1,5- бисфосфата (Рубиско), фермента с двойной функцией. Он может действовать как оксигеназа или как карбоксилаза, в зависимости от относительных количеств $O_2$ и $CO_2$, присутствующих в хлоропластах. $CO_2$-фиксирующая активность фермента Рубиско становится выше с повышением температуры до определенного показателя, а далее уменьшается [62]. Температура представляет собой ограничивающий фактор для скорости роста водорослей и продукции биомассы, поскольку она оказывает влияние на сродство рибулозы к $CO_2$. Температуру также можно использовать как средство от стресса, чтобы стимулировать выработку ценных метаболитов [63-65].

### 4.1.3. Питательные вещества

Фосфор, азот, и углерод являются основополагающими для микроводорослей и классифицируются как макроэлементы, крайне нужные для роста водорослей. Некоторым видам морских микроводорослей также нуждаются в кремние в качестве макроэлемента. Микроводоросли поглощают кислород и водород из воды. Количество макроэлементов, таких как азот и фосфор,может варьироваться между видами микроводорослей. Азот обычно составляет около 10-15% от сухого веса клеток и является важным компонентом всех структурных и функциональных белков в клетках водорослей [66-68]. В целом, микроводоросли обладают ограниченной способностью вещества, накапливающие азот, при выращивании в соответствующих азотсодержащих условиях, исключение составляют цианофицин и фикоцианин, которые, как было установлено, являются азотоаккумулирующими соединениями во многих цианобактериях. Когда микроводоросли выращиваются в условиях ограничения азота, наиболее

заметным эффектом является активная и специфическая деградация фикобилисомами. Пока внутриклеточный азот не опускается ниже порогового уровня, фотосинтез продолжается, хотя и с пониженной скоростью. До тех пор, пока клеточный азот не упадет ниже порогового значения, фотосинтез все еще продолжается, хотя и с пониженной скоростью [69-72]. Потоки углерода, фиксируемые в процессе фотосинтеза, в этих условиях отклоняются от пути синтеза белка в сторону синтеза липидов или углеводов.

Микроэлементы Fe, Mo, Zn, K, B Co, Mg и Mn оказывают сильное влияние на рост микроводорослей, поскольку они влияют на деятельность многих ферментов в клетках водорослей, хотя требуются лишь в минимальных количествах [73-75]. Обычно неорганический азот и фосфор усваиваются в виде нитрата и фосфата. Мочевина также является подходящей и экономичной альтернативой другим неорганическим источникам азота. Углерод может быть добавлен в культуры водорослей в виде органических веществ, таких как глицерин и ацетат, или в виде CO2. Но для крупномасштабного выращивания микроводорослей в качестве источника углерода нужно использовать углекислый газ из окружающей среды, что не только способствует уменьшению издержек, но и предоставляет дополнительное достоинство в виде снижения выбросов CO2 [76]. Нехватка питательных веществ сильно оказывает влияние на скорость роста микроводорослей и и приводит к низкой биомассе, а обеспечение питательными веществами оказывает влияние на синтез и накопление углеводов и липидов в микроводорослях [77-82].

### 4.1.4. Аэрация и перемешивание

Аэрация и перемешивание обеспечивают равномерное распределение питательных веществ, воздуха и CO2 в культурах микроводорослей, а также проникновение света и его равномерное распределение в культуре, предотвращают седиментацию и агрегацию биомассы [83]. Если микроводоросли чувствительны к силе сдвига, чрезмерное перемешивание может привести к повреждению клеток и разрушению культуры [84].

Время смешивания является глобальной мерой смешивания и определяется как время, необходимое для достижения введенным индикатором заданной однородности, которая достаточно близка к идеальному смешанному состоянию. На практике время смешивания определяется как время, необходимое для достижения системой однородного состояния в пределах отклонения в 5%после введения трассера [85].

Даже если все остальные требования соблюдены, при неудачном смешивании продуктивность биомассы значительно снизится. Поэтому культуры микроводорослей необходимо постоянно перемешивать, чтобы все клетки находились во взвешенном состоянии и имели свободный доступ к свету. Подходящая система перемешивания в фотобиореакторе также обеспечивает эффективный газообмен.

### 4.1.5. pH и соленость при культивировании

Важным фактором, влияющим на рост микроводорослей, является pH культуральной среды. Различные виды микроводорослей имеют разные требования к pH; многие из них хорошо растут при pH5-8.Значение pH варьируется в зависимости от источника питательной среды. Большинство водорослей чувствительны к pH, и лишь некоторые из них могут расти в широком диапазоне pH, например,хлорелла, но максимальные темпы роста и продуктивность биомассы отмечаются при pH 8-9. Повышение pH увеличивает соленость культуральной среды и очень вредно для клеток цианобактерий [86-92].

Наиболее важными осмотическими веществами в микроводорослях являются полиолы. К распространенным полиолам водорослей относятся глицерин, маннит, галактоза, сорбит, галактозид глицерина, сахароза и трегалоза. Деградация крахмала может как-то объяснить биосинтез глицерина, но неясно, как молекулярный механизм разделения углерода между крахмалом и глицерином регулируется в солевых условиях в этом организме.

### 4.1.6. Миксотрофное выращивание

В автотрофных культурах микроорганизмы используют световую энергию для производства энергии, в то время как в гетеротрофных культурах они используют органические источники углерода для метаболизма. В миксотрофных условиях, сочетающих автотрофную и гетеротрофную модели, культивируемые микроорганизмы будут иметь как запас неорганического углерода для фиксации путем фотосинтеза, так и источники органического углерода, такие как сахара и глицерин [93-94]. Микроорганизмы в миксотрофной культуре растут быстрее и способны синтезировать соединения как автотрофным, так и гетеротрофным способом. В тоже время снижается потребление световой энергии и органических соединений [95].

## 4.2. Фотобиореакторы

Фотобиореакторы это реакторы, используемые для культивирования фототрофов (микроорганизмы, водоросли или растительные клетки) или используются для проведения фотобиологической реакции [96]. В широком смысле открытые неглубокие бассейны, которые широко используются для выращивания микроводорослей, также можно считать фотобиореакторами. Но в этой главе термин "фотобиореактор" будет использоваться только для закрытых систем [97]. В настоящее время коммерческое производство фототрофной микробной биомассы ограничено несколькими видами микроводорослей, культивируемых в открытых прудах с использованием селективных сред и высокой скоростью роста [98]. Большинство чистых культур микроводорослей не могут достаточно долго сохраняться в открытых системах на открытом воздухе из-за риска заражения грибами, бактериями и простейшими, а также имеющийся конкуренции со стороны других микроводорослей, которые имеют тенденцию доминировать независимо от исходного вида, используемого в качестве инокулята [99]. Фотобиореакторы обеспечивают закрытую среду культивирования, защищенную от прямых осадков, относительно безопасную от контаминации конкурирующими микроорганизмами и где условия могут

лучше контролироваться для обеспечения доминирования интересующих видов [100]. Исходя из этого, можно сказать, что применение фотобиореактора позволит использовать потенциал более чем 80 000 известных видов микроводорослей, многие из которых могут быть новыми и эффективными источниками высокоценных соединений [101-102].

По сравнению с открытыми водоемами, культура в закрытых фотобиореакторах более контролируема. Это дает возможность регулировать и контролировать большинство биотехнологически важных параметров при определении продуктивности [121]. Закрытые системы также имеют большее отношение площади поверхности к объему, чем открытые системы, что приводит к повышению эффективности, сокращению времени сбора урожая и возможности культивирования более широкого разнообразия видов водорослей. В целом, закрытые фотобиореакторы представляют собой набор тонких панелей из прозрачных трубок или пластин, размещенных в правильном положении лицом к источнику солнечного света. Двумя распространенными системами, отвечающими за циркуляцию, являются механические насосы и эрлифты. Система обычно состоит из двух основных частей: "уборочного блока", который обеспечивает высокое соотношение площади и объема для эффективного фотосинтеза, и"блока газообмена", который обрабатывает подачу CO2 и сбор биомассы. Конструкции фотобиореакторов можно разделить на три типа: трубчатые, плоские и с внутренней подсветкой [122].

Технология водорослей имеет потенциал для решения глобального энергетического кризиса, недоеданием и производством нескольких полезных для человечества продуктов с добавленной стоимостью[123]. Экономически эффективная система выращивания является основополагающими для достижения цели. Крупномасштабное производство микроводорослей в прудах представляется наиболее экономически выгодным, эколонически чистым и инженерно – перспективным вариантом.

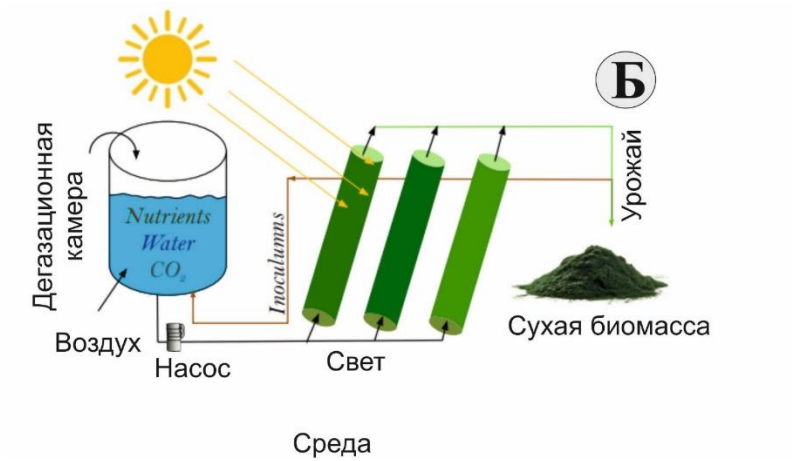



Рис. 1. Трубчатый фотобиореактор с параллельными горизонтальными трубками

[124]. Вертикальное перемешивание является важным критерием, влияющим на рост водорослей, по сравнению с осевым перемешиванием, поскольку оно определяет, как часто клетки перемещаются со дна на поверхность открытого водоема. По данной причине был проведены различные исследовательские работы по различным конструкциям прудов с дорожками качения направленные на усиление вертикального смешивания и времени пребывания $CO_2$. Это исследование обобщает текущее состояние знаний о производстве биомассы в прудах с гоночными трассами [125].

Считается, что фотобиореакторы имеют ряд преимуществ перед с открытыми прудами: возможность предотвращения или сведение к минимуму риск контаминациии, обеспечение строгого контроля над условиями культивирования, предотвращение испарения и снижения потерь CO2 из-за выделения газов, а также возможность достижениях более высоких концентраций клеток и объемной производительности [126].

При создании фотобиореактора, они могут быть сконструированы с различными световыми путями, что является

ключевым фактором для достижения высоких показателей производительности и эффективности использования солнечной энергии, а также применение различных типов насосов или воздушного барботажа для перемешивания. Их конструкция может быть выполнена из самых различных материалов: складные или жесткие трубы, пластиковые или стеклянные листы, а также множество различных конструкций [127,128].

В заключение, следует отметить что закрытые реакторы являются гибкими системами, которые могут быть оптимизированы в соответствии с биологическими и физиологическими характеристиками культивируемых видов водорослей. Однако последнее и наиболее важное преимущество закрытых систем заключается в том, что они позволяют культивировать те виды водорослей, которые нельзя выращивать в открытых водоемах. Но у закрытые систем, имеется ряд недостатков (перегрев, накопление кислорода, биообрастание, повреждение клеток напряжением сдвига, износ материала, используемого для фотостудии), которые могут привести к катастрофе, если не будут должным образом не рассмотрены и устранены.

### 4.3. Открытые пруды

Культивирование микроводорослей в коммерческих целях в настоящее время преимущественно осуществляется, в открытых системах. Основной причиной является то, что большие открытые пруды легче и дешевле строить и эксплуатировать, чем большие закрытые реакторы, и они более долговечны [103] Для выращивания микроводорослей был разработано и испытано множество ряд типов прудов. Они отличаются меж собой по размеру, форме, материалу, применяемому для изготовления, типу перемешивания и наклону. Во многих случаях проект строительства по существу определяется местными условиями и доступными материалами [104-108]. Материалы, применяемые при строительстве стен и дна, а также для облицовки, определяют производительность,

стоимость и срок эксплуатации пруда. Диапазон применяемых материалов широк от простого песка, глины до кирпича или цемента, а также дорогих пластмасс, стекловолокно или полиуретан [109-111]. Для уменьшения затрат было предложено использовать неосвещенные пруды. При применении прудов без подкладки возникают проблемы с просачиванием и сильным загрязнением, снижением количества используемых видов водорослей и определенными почвенными и экологическими условиями [112].

Несмотря на различные предложенные типы прудов, только три основные конструкции были разработаны и эксплуатируются в относительно крупных масштабах [113-115]:

(1)Наклонные системы, где смешивание осуществляется с помощью насосов и силы тяжести.

(2)Круглые пруды с вращающимся рычагом для перемешивания.

(3)пруды с дорожками качания, построенные в виде бесконечной петли, в котором культура циркулирует с помощью лопастных колес.

Пруды с дорожками качания являются наиболее типичными открытыми прудами. Крупнейшее туннельное предприятие по производству биомассы находится в Калипатрии, штат Калифорния (США).Это предприятие занимает площадь 440 000 м2 для выращивания спирулины для продуктов питания человека [112]. Пруды - каплеуловители представляют собой рециркуляционные каналы с замкнутым контуром и имеют овальную форму (рис. 2). Это либо уплотненная земляная конструкция с пластиковой мембраной толщиной 1-2 мм, либо стена или перегородка из бетонных блоков с пластиковой мембраной для предотвращения протечек. Пруды обычно имеют глубину 0,25-0,30 м и занимают площадь до 0,5 га [116,117,118]. Размер пруда не пропорционален глубине. Небольшая глубина увеличивает долю площади поверхности и улучшает проникновение света для эффективного фотосинтеза.




Рис. 2. Выращивание с использованием солнечного света в открытых системах

**Список использованных источников**

1. Ooms, Matthew D., Cao Thang Dinh, Edward H. Sargent, и David Sinton. «Photon Management for Augmented Photosynthesis». Nature Communications 7, вып. 1 (1 сентябрь 2016 г.): 12699. https://doi.org/10.1038/ncomms12699.

2. Farooq, Wasif. «Sustainable Production of Microalgae Biomass for Biofuel and Chemicals through Recycling of Water and Nutrient within the Biorefinery Context: A Review». *GCB Bioenergy* 13, вып. 6 (2021 г.): 914–40. https://doi.org/10.1111/gcbb.12822.

3. Patwardhan, Sanchita Bipin, Soumya Pandit, Dipankar Ghosh, Dolly Wattal Dhar, Srijoni Banerjee, Sanket Joshi, Piyush Kumar Gupta, и др. «A Concise Review on the Cultivation of Microalgal Biofilms for Biofuel Feedstock Production». *Biomass Conversion and Biorefinery*, 17 май 2022 г. https://doi.org/10.1007/s13399-022-02783-9.

4. «Biofuel Formation from Microalgae: A Renewable Energy Source for Eco-Sustainability». *Current World Environment* Volume 17, вып. Issue 1. Просмотрено 13 июль 2022 г.

https://www.cwejournal.org/vol17no1/biofuel-formation-from-microalgae--a-renewable-energy-source-for-eco-sustainability.

5. Hussian, Abd Ellatif Mohamed. *The Role of Microalgae in Renewable Energy Production: Challenges and Opportunities*. *Marine Ecology - Biotic and Abiotic Interactions*. IntechOpen, 2018. https://doi.org/10.5772/intechopen.73573.

6. Benedetti, Manuel, Valeria Vecchi, Simone Barera, и Luca Dall'Osto. «Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories». *Microbial Cell Factories* 17, вып. 1 (10 ноябрь 2018 г.): 173. https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3.

7. Onyeaka, Helen, Taghi Miri, KeChrist Obileke, Abarasi Hart, Christian Anumudu, и Zainab T. Al-Sharify. «Minimizing Carbon Footprint via Microalgae as a Biological Capture». *Carbon Capture Science & Technology* 1 (1 декабрь 2021 г.): 100007. https://doi.org/10.1016/j.ccst.2021.100007.

8. Dolganyuk, Vyacheslav, Daria Belova, Olga Babich, Alexander Prosekov, Svetlana Ivanova, Dmitry Katserov, Nikolai Patyukov, и Stanislav Sukhikh. «Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts». *Biomolecules* 10, вып. 8 (6 август 2020 г.): 1153. https://doi.org/10.3390/biom10081153.

9. Chojnacka, Katarzyna, и Agnieszka Saeid. *Recent Advances in Trace Elements*. John Wiley & Sons, 2018.

10. Liu, Anli, Siqi Li, Nana Cen, Fuying Mao, Ruixia Yang, Linfei Li, Hong Sui, и Yunsheng Zhao. «Concentration of Fifteen Elements in Herbaceous Stems of Ephedra Intermedia and Influence of Its Growing Soil». *Scientific Reports* 10, вып. 1 (15 сентябрь 2020 г.): 15077. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72048-w.

11. Farag, Ihab, и K Price. «Resources Conservation in Microalgae Biodiesel Production». *"International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR* 1 (1 октябрь 2013 г.): 49–56.

12. Duan, Yuhua, и Fan Shi. «Bioreactor design for algal growth as a sustainable energy source». В *Reactor and Process Design in Sustainable Energy Technology*, 27–60, 2014. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59566-9.00002-8.

13. Murthy, Ganti S. «Chapter 18 - Overview and Assessment of Algal Biofuels Production Technologies». В *Biofuels*, под редакцией Ashok Pandey, Christian Larroche, Steven C. Ricke,

Claude-Gilles Dussap, и Edgard Gnansounou, 415–37. Amsterdam: Academic Press, 2011. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00019-X.

14. Narala, Rakesh R., Sourabh Garg, Kalpesh K. Sharma, Skye R. Thomas-Hall, Miklos Deme, Yan Li, и Peer M. Schenk. «Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System». *Frontiers in Energy Research* 4 (2016 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2016.00029.

15. Benner, Philipp, Lisa Meier, Annika Pfeffer, Konstantin Krüger, José Enrique Oropeza Vargas, и Dirk Weuster-Botz. «Lab-Scale Photobioreactor Systems: Principles, Applications, and Scalability». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 45, вып. 5 (1 май 2022 г.): 791–813. https://doi.org/10.1007/s00449-022-02711-1.

16. Abdel-Raouf, N., A. A. Al-Homaidan, и I. B. M. Ibraheem. «Microalgae and Wastewater Treatment». *Saudi Journal of Biological Sciences* 19, вып. 3 (1 июль 2012 г.): 257–75. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005.

17. Mohsenpour, Seyedeh Fatemeh, Sebastian Hennige, Nicholas Willoughby, Adebayo Adeloye, и Tony Gutierrez. «Integrating Micro-Algae into Wastewater Treatment: A Review». *Science of The Total Environment* 752 (15 январь 2021 г.): 142168. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168.

18. Muylaert, Koenraad, Annelies Beuckels, Orily Depraetere, Imogen Foubert, Giorgos Markou, и Dries Vandamme. «Wastewater as a Source of Nutrients for Microalgae Biomass Production», 75–94, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16640-7_5.

19. Martinis, Domenico De, Eugenio Benvenuto, Nicola Colonna, Briardo Llorente, и Edward Rybicki. *Next Generation Agriculture: Understanding Plant Life for Food, Health and Energy*. Frontiers Media SA, 2020.

20. Mutanda, T., D. Naidoo, J. K. Bwapwa, и A. Anandraj. «Biotechnological Applications of Microalgal Oleaginous Compounds: Current Trends on Microalgal Bioprocessing of Products». *Frontiers in Energy Research* 8 (2020 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2020.598803.

21. Tan, Jia Sen, Sze Ying Lee, Kit Wayne Chew, Man Kee Lam, Jun Wei Lim, Shih-Hsin Ho, и Pau Loke Show. «A review on

microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids». *Bioengineered* 11, вып. 1 (24 январь 2020 г.): 116–29. https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626.

22. Udayan, Aswathy, Ashutosh Kumar Pandey, Ranjna Sirohi, Nidhin Sreekumar, Byoung-In Sang, Sung Jun Sim, Sang Hyoun Kim, и Ashok Pandey. «Production of Microalgae with High Lipid Content and Their Potential as Sources of Nutraceuticals». *Phytochemistry Reviews*, 23 январь 2022 г. https://doi.org/10.1007/s11101-021-09784-y.

23. Mehta, Preeti, Rekha Rani, Ravi Gupta, Anshu Shankar Mathur, и Suresh Kumar Puri. «Biomass and Lipid Production of a Novel Freshwater Thermo-Tolerant Mutant Strain of Chlorella Pyrenoidosa NCIM 2738 in Seawater Salinity Recycled Medium». *Algal Research* 36 (1 декабрь 2018 г.): 88–95. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.015.

24. Mehtani, Juhi, Neha Arora, Alok Patel, Priyanka Jain, Parul A. Pruthi, Kirshna Mohan Poluri, и Vikas Pruthi. «Augmented Lipid Accumulation in Ethyl Methyl Sulphonate Mutants of Oleaginous Microalga for Biodiesel Production». *Bioresource Technology*, Special Issue on International Conference on Current Trends in Biotechnology & post ICCB-2016 conference on Strategies for Environmental Protection and Management (ICSEPM-2016), 242 (1 октябрь 2017 г.): 121–27. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.108.

25. Fernández-Linares, Luis C., Claudia Guerrero Barajas, Enrique Durán Páramo, и Jesús A. Badillo Corona. «Assessment of Chlorella Vulgaris and Indigenous Microalgae Biomass with Treated Wastewater as Growth Culture Medium». *Bioresource Technology* 244 (1 ноябрь 2017 г.): 400–406. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.141.

26. Ebhodaghe, Samuel Ogbeide, Ojeaga Evans Imanah, и Henry Ndibe. «Biofuels from Microalgae Biomass: A Review of Conversion Processes and Procedures». *Arabian Journal of Chemistry* 15, вып. 2 (1 февраль 2022 г.): 103591. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103591.

27. Chowdury, Kamrul Hasan, Nurun Nahar, и Ujjwal Kumar Deb. «The Growth Factors Involved in Microalgae Cultivation for

Biofuel Production: A Review». Computational Water, Energy, and Environmental Engineering 9, вып. 4 (17 август 2020 г.): 185–215. https://doi.org/10.4236/cweee.2020.94012.

28. Daneshvar, Ehsan, Yong Sik Ok, Samad Tavakoli, Binoy Sarkar, Sabry M. Shaheen, Hui Hong, Yongkang Luo, Jörg Rinklebe, Hocheol Song, и Amit Bhatnagar. «Insights into Upstream Processing of Microalgae: A Review». *Bioresource Technology* 329 (1 июнь 2021 г.): 124870. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870.

29. Hossain, Nazia, и Teuku Meurah Indra Mahlia. «Progress in physicochemical parameters of microalgae cultivation for biofuel production». *Critical Reviews in Biotechnology* 39, вып. 6 (18 август 2019 г.): 835–59. https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1624945.

30. Nchindia, Fonge Emmanuel. «Design of a Stand-Alone 1000-KW Biogas Power Plant from Codigestion of Organic Waste and Microalgae Grown in a Tubular Photo Bioreactor at Bomaka-Buea». *IET Renewable Power Generation* n/a, вып. n/a. Просмотрено 13 июль 2022 г. https://doi.org/10.1049/rpg2.12524.

31. Show, Pau Loke, Malcolm S. Y. Tang, Dillirani Nagarajan, Tau Chuan Ling, Chien-Wei Ooi, и Jo-Shu Chang. «A Holistic Approach to Managing Microalgae for Biofuel Applications». *International Journal of Molecular Sciences* 18, вып. 1 (22 январь 2017 г.): 215. https://doi.org/10.3390/ijms18010215.

32. Singh, Nirbhay, и Dolly Dhar. «Microalgae as second generation biofuel. A review». Agronomy for Sustainable Development 31, вып. 4 (2011 г.): 605–29. https://doi.org/10.1007/s13593-011-0018-0.

33. Enamala, Manoj Kumar, Swapnika Enamala, Murthy Chavali, Jagadish Donepudi, Rajasri Yadavalli, Bhulakshmi Kolapalli, Tirumala Vasu Aradhyula, Jeevitha Velpuri, и Chandrasekhar Kuppam. «Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 94 (2018 г.): 49.

34. Sreekumar, Nidhin, M. S. Giri Nandagopal, Aneesh Vasudevan, Rahul Antony, и N. Selvaraju. «Marine microalgal culturing in open pond systems for biodiesel production—Critical

parameters». *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 8, вып. 2 (2016 г.): 023105.

35. ZHU, Junying, Junfeng RONG, и Baoning Zong. «Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel». *Chinese Journal of Catalysis* 34 (31 январь 2013 г.): 80–100. https://doi.org/10.1016/S1872-2067(11)60497-X.

36. Petsas, Andreas S., и Maria C. Vagi. *Effects on the Photosynthetic Activity of Algae after Exposure to Various Organic and Inorganic Pollutants: Review*. *Chlorophyll*. IntechOpen, 2017. https://doi.org/10.5772/67991.

37. Misawa, Norihiko. «1.20 - Carotenoids». В *Comprehensive Natural Products II*, под редакцией Hung-Wen (Ben) Liu и Lew Mander, 733–53. Oxford: Elsevier, 2010. https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00009-5.

38. You, Tao, и Stanley Barnett. «Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of Porphyridium cruentum». *Biochemical Engineering Journal* 19 (1 июль 2004 г.): 251–58. https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.02.004.

39. Friedman, Orit, Zvy Dubinsky, и Shoshana (Malis) Arad. «Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green rhodophyta unicells». *Bioresource Technology* 38, вып. 2–3 (1991 г.): 105–10.

40. Ooms, Matthew, Percival Graham, Brian Nguyen, Edward Sargent, и David Sinton. «Light dilution via wavelength management for efficient high-density photobioreactors». *Biotechnology and Bioengineering* 114 (1 февраль 2017 г.). https://doi.org/10.1002/bit.26261.

41. Costache, Teodor, Gabriel Acien, M Morales, Jose M Fernandez-Sevilla, ioan Stamatin, и Emilio Molina-Grima. «Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactors». *Applied microbiology and biotechnology* 97 (23 июнь 2013 г.). https://doi.org/10.1007/s00253-013-5035-2.

42. Abiusi, Fabian, Rene H. Wijffels, и Marcel Janssen. «Oxygen Balanced Mixotrophy under Day–Night Cycles». *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 8, вып. 31 (10 август 2020 г.): 11682–91. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03216.

43. Ye, Zi-Piao, David Suggett, Piotr Robakowski, и Hua-Jing Kang. «A mechanistic model for the photosynthesis-light response based on the photosynthetic electron transport of photosystem II in C3 and C4 species». *The New phytologist* 199 (22 март 2013 г.). https://doi.org/10.1111/nph.12242.

44. Stambler, Noga, и Zvy Dubinsky. «Stress Effects on Metabolism and Photosynthesis of Hermatypic Corals». В *Coral Health and Disease*, под редакцией Eugene Rosenberg и Yossi Loya, 195–215. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06414-6_9.

45. Fryer, Michael J., James R. Andrews, Kevin Oxborough, David A. Blowers, и Neil R. Baker. «Relationship between CO2 Assimilation, Photosynthetic Electron Transport, and Active O2 Metabolism in Leaves of Maize in the Field during Periods of Low Temperature». *Plant Physiology* 116, вып. 2 (февраль 1998 г.): 571–80.

46. Werner, C., R. J. Ryel, O. Correia, и W. Beyschlag. «Effects of Photoinhibition on Whole-Plant Carbon Gain Assessed with a Photosynthesis Model». *Plant, Cell & Environment* 24, вып. 1 (2001 г.): 27–40. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00651.x.

47. González-Camejo, J., A. Viruela, M. V. Ruano, R. Barat, A. Seco, и J. Ferrer. «Effect of Light Intensity, Light Duration and Photoperiods in the Performance of an Outdoor Photobioreactor for Urban Wastewater Treatment». *Algal Research* 40 (1 июнь 2019 г.): 101511. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101511.

48. Masojídek, Jiří, Karolína Ranglová, Gergely Ernö Lakatos, Ana Margarita Silva Benavides, и Giuseppe Torzillo. «Variables Governing Photosynthesis and Growth in Microalgae Mass Cultures». *Processes* 9, вып. 5 (май 2021 г.): 820. https://doi.org/10.3390/pr9050820.

49. Bazdar, Elahe, Ramin Roshandel, Soheila Yaghmaei, и Mohammad Mahdi Mardanpour. «The effect of different light intensities and light/dark regimes on the performance of photosynthetic microalgae microbial fuel cell». *Bioresource Technology* 261 (1 апрель 2018 г.). https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.026.

50. Maltsev, Yevhen, Kateryna Maltseva, Maxim Kulikovskiy, и Svetlana Maltseva. «Influence of Light Conditions on Microalgae

Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition». *Biology* 10, вып. 10 (октябрь 2021 г.): 1060. https://doi.org/10.3390/biology10101060.

51. Kato, Yuichi, Yusuke Fujihara, Christopher J. Vavricka, Jo-Shu Chang, Tomohisa Hasunuma, и Akihiko Kondo. «Light/dark cycling causes delayed lipid accumulation and increased photoperiod-based biomass yield by altering metabolic flux in oleaginous Chlamydomonas sp.» *Biotechnology for Biofuels* 12, вып. 1 (21 февраль 2019 г.): 39. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1380-4.

52. Seo, Seong-Hyun, Ji-San Ha, Chan Yoo, Ankita Srivastava, Chi-Yong Ahn, Dae-Hyun Cho, Hyun-Joon La, Myung-Soo Han, и Hee-Mock Oh. «Light intensity as major factor to maximize biomass and lipid productivity of Ettlia sp. in CO 2 -controlled photoautotrophic chemostat». *Bioresource Technology* 244 (1 август 2017 г.). https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.020.

53. Maltsev, Yevhen, Kateryna Maltseva, Maxim Kulikovskiy, и Svetlana Maltseva. «Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition». *Biology* 10, вып. 10 (18 октябрь 2021 г.): 1060. https://doi.org/10.3390/biology10101060.

54. Chapman, David J., John De-Felice, и James Barber. «Growth Temperature Effects on Thylakoid Membrane Lipid and Protein Content of Pea Chloroplasts». *Plant Physiology* 72, вып. 1 (май 1983 г.): 225–28.

55. Yu, Linhui, Chao Zhou, Jilian Fan, John Shanklin, и Changcheng Xu. «Mechanisms and Functions of Membrane Lipid Remodeling in Plants». *The Plant Journal* 107, вып. 1 (2021 г.): 37–53. https://doi.org/10.1111/tpj.15273.

56. Rudolphi-Skórska, Elżbieta, и Apolonia Sieprawska. «Physicochemical Techniques in Description of Interactions in Model and Native Plant Membranes under Stressful Conditions and in Physiological Processes». *Acta Physiologiae Plantarum* 38, вып. 1 (24 декабрь 2015 г.): 22. https://doi.org/10.1007/s11738-015-2034-1.

57. López-Sánchez, Anaid, Ana Laura Silva-Gálvez, Óscar Aguilar-Juárez, Carolina Senés-Guerrero, Danielle A. Orozco-Nunnelly, Danay Carrillo-Nieves, и Misael Sebastián Gradilla-

Hernández. «Microalgae-Based Livestock Wastewater Treatment (MbWT) as a Circular Bioeconomy Approach: Enhancement of Biomass Productivity, Pollutant Removal and High-Value Compound Production». *Journal of Environmental Management* 308 (15 апрель 2022 г.): 114612. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114612.

58. Béchet, Quentin, Martin Laviale, Nicolas Arsapin, Hubert Bonnefond, и Olivier Bernard. «Modeling the impact of high temperatures on microalgal viability and photosynthetic activity». *Biotechnology for Biofuels* 10 (26 май 2017 г.): 136. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0823-z.

59. Elisabeth, Bermejo, Filali Rayen, и Taidi Behnam. «Microalgae culture quality indicators: a review». *Critical Reviews in Biotechnology* 41, вып. 4 (19 май 2021 г.): 457–73. https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1854672.

60. Mathur, Sonal, Divya Agrawal, и Anjana Jajoo. «Photosynthesis: Response to High Temperature Stress». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Stress and Photosynthesis, 137 (1 август 2014 г.): 116–26. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.010.

61. Haldimann, P., и U. Feller. «Inhibition of Photosynthesis by High Temperature in Oak (Quercus Pubescens L.) Leaves Grown under Natural Conditions Closely Correlates with a Reversible Heat-Dependent Reduction of the Activation State of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase». *Plant, Cell & Environment* 27, вып. 9 (2004 г.): 1169–83. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01222.x.

62. Raghavendra, A. S., B. Sunil, и R. B. Bapatla. «C3 Plants». В *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, под редакцией Brian Thomas, Brian G Murray, и Denis J Murphy, 44–51. Oxford: Academic Press, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00090-3.

63. Wu, Zhe, Promchup Duangmanee, Pu Zhao, Niran Juntawong, и Chunhong Ma. «The Effects of Light, Temperature, and Nutrition on Growth and Pigment Accumulation of Three Dunaliella salina Strains Isolated from Saline Soil». *Jundishapur Journal of Microbiology* 9, вып. 1 (2 январь 2016 г.): e26732. https://doi.org/10.5812/jjm.26732.

64. Kanno, Keiichi, Yuji Suzuki, и Amane Makino. «A Small Decrease in Rubisco Content by Individual Suppression of RBCS Genes Leads to Improvement of Photosynthesis and Greater Biomass Production in Rice Under Conditions of Elevated CO2». *Plant & Cell Physiology* 58, вып. 3 (1 март 2017 г.): 635–42. https://doi.org/10.1093/pcp/pcx018.

65. Freitas, Emanuelle Neiverth de, José Carlos Santos Salgado, Robson Carlos Alnoch, Alex Graça Contato, Eduardo Habermann, Michele Michelin, Carlos Alberto Martínez, и Maria de Lourdes T. M. Polizeli. «Challenges of Biomass Utilization for Bioenergy in a Climate Change Scenario». *Biology* 10, вып. 12 (декабрь 2021 г.): 1277. https://doi.org/10.3390/biology10121277.

66. Yaakob, Maizatul Azrina, Radin Mohamed, Adel Al-Gheethi, Ravishankar Gokare, и Dr. Ranga Rao Ambati. «Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview». Cells 10 (14 февраль 2021 г.): 393. https://doi.org/10.3390/cells10020393.

67. Su, Yanyan. «Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment». *Science of The Total Environment* 762 (1 декабрь 2020 г.): 144590. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590.

68. Rinanti, Astri. *Biotechnology Carbon Capture and Storage by Microalgae to Enhance CO2 Removal Efficiency in Closed-System Photobioreactor*. *Algae - Organisms for Imminent Biotechnology*. IntechOpen, 2016. https://doi.org/10.5772/62915.

69. Cao, Zihao, Xiaotong Shen, Xujing Wang, Baohua Zhu, Kehou Pan, и Yun Li. «Effect of Nitrogen Concentration on the Alkalophilic Microalga Nitzschia sp. NW129-a Promising Feedstock for the Integrated Production of Lipids and Fucoxanthin in Biorefinery». *Frontiers in Marine Science* 8 (2022 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.830590.

70. Wingard, Lauren, Scott Miller, Jeanne Sellker, Erik Stenn, Mary Allen, и A. Wood. «Cyanophycin Production in a Phycoerythrin-Containing Marine Synechococcus Strain of Unusual Phylogenetic Affinity». *Applied and environmental microbiology* 68 (1 май 2002 г.): 1772–77. https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1772-1777.2002.

71. Eltanahy, Eladl, и Aya Torky. «CHAPTER 1 Microalgae as Cell Factories: Food and Feed-Grade High-Value Metabolites», 2021 г., 1–35. https://doi.org/10.1039/9781839162473-00001.

72. Kolodny, Nancy H., Deborah Bauer, Kerstyn Bryce, Kristen Klucevsek, Amy Lane, Lea Medeiros, Wendy Mercer, и др. «Effect of Nitrogen Source on Cyanophycin Synthesis in Synechocystis sp. Strain PCC 6308». *Journal of Bacteriology* 188, вып. 3 (февраль 2006 г.): 934–40. https://doi.org/10.1128/JB.188.3.934-940.2006.

73. Fox, Joe, и Paul Zimba. «Minerals and Trace Elements in Microalgae», 177–93, 2018. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00008-6.

74. Circuncisão, Ana R., Marcelo D. Catarino, Susana M. Cardoso, и Artur M. S. Silva. «Minerals from Macroalgae Origin: Health Benefits and Risks for Consumers». *Marine Drugs* 16, вып. 11 (23 октябрь 2018 г.): 400. https://doi.org/10.3390/md16110400.

75. Ammar, Esraa E., Ahmed A. A. Aioub, Ahmed E. Elesawy, Ali M. Karkour, Moustafa S. Mouhamed, Aliaa A. Amer, и Nouran A. EL-Shershaby. «Algae as Bio-Fertilizers: Between Current Situation and Future Prospective». *Saudi Journal of Biological Sciences* 29, вып. 5 (1 май 2022 г.): 3083–96. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.03.020.

76. SESHADRI, S., S. IGNACIMUTHU, и C. LAKSHMINARASIMHAN. «Effect of Nitrogen and Carbon Sources on the Inorganic Phosphate Solubilization by Different Aspergillus Niger Strains». *Chemical Engineering Communications* 191, вып. 8 (1 август 2004 г.): 1043–52. https://doi.org/10.1080/00986440490276308.

77. Panahi, Yunes, Ahmad Yari Khosroushahi, Amirhossein Sahebkar, и Hamid Reza Heidari. «Impact of Cultivation Condition and Media Content onChlorella vulgaris Composition». *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 9, вып. 2 (июнь 2019 г.): 182–94. https://doi.org/10.15171/apb.2019.022.

78. Abo-State, Mervat Aly Mohamed, Sanaa Mahmoud Metwally Shanab, и Hamdy Elsayed Ahmed Ali. «Effect of Nutrients and Gamma Radiation on Growth and Lipid Accumulation of Chlorella Vulgaris for Biodiesel Production». *Journal of*

*Radiation Research and Applied Sciences* 12, вып. 1 (1 январь 2019 г.): 332–42. https://doi.org/10.1080/16878507.2019.1662216.

79. Andreeva, Anna, Ekaterina Budenkova, Olga Babich, Stanislav Sukhikh, Vyacheslav Dolganyuk, Philippe Michaud, и Svetlana Ivanova. «Influence of Carbohydrate Additives on the Growth Rate of Microalgae Biomass with an Increased Carbohydrate Content». *Marine Drugs* 19, вып. 7 (1 июль 2021 г.): 381. https://doi.org/10.3390/md19070381.

80. Yang, Lei, Jun Chen, Shan Qin, Min Zeng, Yongguang Jiang, Lang Hu, Peng Xiao, и др. «Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga Chlamydomonas reinhardtii». *Biotechnology for Biofuels* 11, вып. 1 (13 февраль 2018 г.): 40. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1041-z.

81. Roleda, Michael, Steve Slocombe, Raymond Leakey, John Day, Elanor Bell, и Michele Stanley. «Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy». *Bioresource technology* 129C (19 ноябрь 2012 г.): 439–49. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.043.

82. Vale, Miguel A., António Ferreira, José C. M. Pires, и Ana L. Gonçalves. «Chapter 17 - CO2 Capture Using Microalgae». В *Advances in Carbon Capture*, под редакцией Mohammad Reza Rahimpour, Mohammad Farsi, и Mohammad Amin Makarem, 381–405. Woodhead Publishing, 2020. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819657-1.00017-7.

83. Acien, Gabriel, Emilio Molina-Grima, Alberto Reis, Giuseppe Torzillo, Graziella Chini Zittelli, Sepulveda Claudia, и Jiří Masojídek. «Photobioreactors for the production of microalgae». В *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, 1–44, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7.

84. Mazzuca-Sobczuk, Tania, FRANCISCO CAMACHO, Emilio Molina-Grima, и Yusuf Chisti. «Effects of agitation on the microalgae Phaeodactylum tricornutum and Porphyridium cruentum». *Bioprocess and biosystems engineering* 28 (1 апрель 2006 г.): 243–50. https://doi.org/10.1007/s00449-005-0030-3.

85. «Real-Time NIR Monitoring of Pharmaceutical Blending Processes with Multivariate Quantitative Models». *European*

*Pharmaceutical Review*. Просмотрено 14 июль 2022 г. https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/732/real-time-nir-monitoring-of-pharmaceutical-blending-processes-with-multivariate-quantitative-models/.

86. Qiu, Renhe, Song Gao, Paola A. Lopez, и Kimberly L. Ogden. «Effects of PH on Cell Growth, Lipid Production and CO2 Addition of Microalgae Chlorella Sorokiniana». *Algal Research* 28 (1 декабрь 2017 г.): 192–99. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004.

87. Goldman, Joel C., Yossef Azov, Carol B. Riley, и Mark R. Dennett. «The Effect of PH in Intensive Microalgal Cultures. I. Biomass Regulation». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 57, вып. 1 (8 январь 1982 г.): 1–13. https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90140-X.

88. Bakuei, Najmeh, Ghazaleh Amini, Ghasem Najafpour, Mohsen Jahanshahi, и Maedeh Mohammadi. «Optimal cultivation of Scenedesmus sp. microalgae in a bubble column photobioreactor». *Indian Journal of Chemical Technology* 22 (1 январь 2015 г.): 20–25.

89. Bakuei, Najmeh, Ghazaleh Amini, Ghasem Najafpour, Mohsen Jahanshahi, и Maedeh Mohammadi. «Optimal cultivation of Scenedesmus sp. microalgae in a bubble column photobioreactor». *Indian Journal of Chemical Technology* 22 (1 январь 2015 г.): 20–25.

90. Chiru, Anghel. *The Automobile and the Environment: International Congress of Automotive and Transport Engineering CONAT 2010*. Cambridge Scholars Publishing, 2011.

91. Barsanti, Laura, и Paolo Gualtieri. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, 2005.

92. Barka, Abakoura, и Christophe Blecker. «Microalgae as a Potential Source of Single-Cell Proteins. A Review». *BASE*, 1 январь 2016 г. https://doi.org/10.25518/1780-4507.13132.

93. Vidotti, Annamaria D. S., Diego M. Riaño-Pachón, Lucia Mattiello, Laís Albuquerque Giraldi, Flavia V. Winck, и Telma T. Franco. «Analysis of Autotrophic, Mixotrophic and Heterotrophic Phenotypes in the Microalgae Chlorella Vulgaris Using Time-Resolved Proteomics and Transcriptomics Approaches». *Algal*

*Research* 51 (1 октябрь 2020 г.): 102060. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102060.

94. Velea, S., F. Oancea, и F. Fischer. «2 - Heterotrophic and Mixotrophic Microalgae Cultivation». В *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, под редакцией Cristina Gonzalez-Fernandez и Raúl Muñoz, 45–65. Woodhead Publishing Series in Energy. Woodhead Publishing, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00002-9.

95. Perez-Garcia, Octavio, Froylan Escalante, Luz de-Bashan, и Yoav Bashan. «Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products». *Water research* 45 (1 август 2010 г.): 11–36. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037.

96. Xu, Zhijun, Shengliang Wang, Chunyu Zhao, Shangsong Li, Xiaoman Liu, Lei Wang, Mei Li, Xin Huang, и Stephen Mann. «Photosynthetic hydrogen production by droplet-based microbial micro-reactors under aerobic conditions». *Nature Communications* 11 (25 ноябрь 2020 г.): 5985. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19823-5.

97. Valchev, Dobril, и Irina Ribarova. «A Review on the Reliability and the Readiness Level of Microalgae-Based Nutrient Recovery Technologies for Secondary Treated Effluent in Municipal Wastewater Treatment Plants». *Processes* 10, вып. 2 (февраль 2022 г.): 399. https://doi.org/10.3390/pr10020399.

98. Parsy, Aurelien, Lucas Bidoire, Myriam Saadouni, Michel Bahuaud, Thomas Elan, Frédéric Périé, и Cecilia Sambusiti. «Impact of Seasonal Variations on Nannochloropsis Oculata Phototrophic Productivity in an Outdoor Pilot Scale Raceway». *Algal Research* 58 (1 октябрь 2021 г.): 102375. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102375.

99. Yun, Jin-Ho, Dae-Hyun Cho, Sujin Lee, Jina Heo, Quynh-Giao Tran, Yong Keun Chang, и Hee-Sik Kim. «Hybrid Operation of Photobioreactor and Wastewater-Fed Open Raceway Ponds Enhances the Dominance of Target Algal Species and Algal Biomass Production». *Algal Research* 29 (1 январь 2018 г.): 319–29. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.037.

100. Pulz, Otto, и Karl Scheibenbogen. «Photobioreactors: Design and Performance with Respect to Light Energy Input». В *Adv*

*Biochem Eng/Biotechnol*, 38:123–52, 2007. https://doi.org/10.1007/BFb0102298.

101. CAMACHO, FRANCISCO, Juan Gallardo, El Belarbi, Yusuf Chisti, и Emilio Molina-Grima. «Photobioreactor scale-up for a shear-sensitive dinoflagellate microalga». *Process Biochemistry* 46 (1 апрель 2011 г.): 936–44. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.005.

102. Vonshak, Avigad, и Giuseppe Torzillo. «Environmental Stress Physiology». *Handbook of Microalgal Culture*, 1 январь 2003 г., 57.

103. Marsullo, Matteo, Alberto Mian, Adriano Ensinas, Giovanni Manente, Andrea Lazzaretto, и François Maréchal. «Dynamic Modeling of the Microalgae Cultivation Phase for Energy Production in Open Raceway Ponds and Flat Panel Photobioreactors». *Frontiers in Energy Research* 3 (1 сентябрь 2015 г.). https://doi.org/10.3389/fenrg.2015.00041.

104. Lopes da Silva, Teresa, и Alberto Reis. «Scale-up Problems for the Large Scale Production of Algae», 125–49, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_6.

105. Patil, Vishwanath, Kjell Reitan, G. Knudsen, Leiv Mortensen, Torsten Källqvist, и E. Olsen. «Microlage as source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture». *Curr Topics Plant Biol* 6 (1 январь 2005 г.): 57–65.

106. Liffman, Kurt, David Paterson, Petar Liovic, и Pratish Bandopadhayay. «Comparing the energy efficiency of different high rate algal raceway pond designs using computational fluid dynamics». *Chemical Engineering Research and Design* 91 (1 февраль 2013 г.): 221–26. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2012.08.007.

107. Mata, Teresa M., António A. Martins, и Nidia S. Caetano. «Microalgae for biodiesel production and other applications: A review». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, вып. 1 (2010 г.): 217.

108. Guduru, Ramesh K., Anurag Ateet Gupta, и Uttakantha Dixit. «Chapter 13 - Biological Processes for CO2 Capture». В *Emerging Carbon Capture Technologies*, под редакцией Mohammad Khalid, Swapnil A. Dharaskar, Mika Sillanpää, и

Humaira Siddiqui, 371–400. Elsevier, 2022. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89782-2.00008-9.

109. Bharti, Randhir K., Aradhana Singh, Dolly Wattal Dhar, и Anubha Kaushik. «Chapter 6 - Biological Carbon Dioxide Sequestration by Microalgae for Biofuel and Biomaterials Production». В *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, под редакцией Indu Shekhar Thakur, Ashok Pandey, Huu Hao Ngo, Carlos Ricardo Soccol, и Christian Larroche, 137–53. Elsevier, 2022. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823500-3.00007-8.

110. Gupta, Abhishek Kumar. «Chapter 12 - Modeling and Molecular Simulation Methods for CO2 Capture». В *Emerging Carbon Capture Technologies*, под редакцией Mohammad Khalid, Swapnil A. Dharaskar, Mika Sillanpää, и Humaira Siddiqui, 347–69. Elsevier, 2022. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89782-2.00003-X.

111. Patil, Vishwanath, Kjell Reitan, Knutsen, Leiv Mortensen, Torsten Källqvist, Yngvar Olsen, Gjermund Vogt, и Hans Gislerød. «Microalgae as a source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture». *Current topics in plant biology* 6 (1 январь 2005 г.): 57–65.

112. Sero, Emmanuel T., Nqobizitha Siziba, Tavengwa Bunhu, Ryman Shoko, и Enock Jonathan. «Biophotonics for Improving Algal Photobioreactor Performance: A Review». *International Journal of Energy Research* 44, вып. 7 (2020 г.): 5071–92. https://doi.org/10.1002/er.5059.

113. Huesemann, M., T. Dale, A. Chavis, B. Crowe, S. Twary, A. Barry, D. Valentine, R. Yoshida, M. Wigmosta, и V. Cullinan. «Simulation of Outdoor Pond Cultures Using Indoor LED-Lighted and Temperature-Controlled Raceway Ponds and Phenometrics Photobioreactors». *Algal Research* 21, вып. C (1 январь 2017 г.). https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.016.

114. Singha, Nandita Barua, Ujjwal Kumar Deb, и Mushfique Shahriar. «Investigation of Flow Dynamics for a Microalgae Suspension in an Open Pond System». *American Journal of Computational Mathematics* 7, вып. 3 (1 август 2017 г.): 195–207. https://doi.org/10.4236/ajcm.2017.73018.

115. Kumar, V, и Shri Jain. «Plants and algae species: Promising renewable energy production source». *Emirates Journal*

*of Food and Agriculture* 26 (1 август 2014 г.). https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i8.18364.

116. Qiu, Renhe, Song Gao, Paola A. Lopez, и Kimberly L. Ogden. «Effects of PH on Cell Growth, Lipid Production and CO2 Addition of Microalgae Chlorella Sorokiniana». *Algal Research* 28 (1 декабрь 2017 г.): 192–99. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004.

117. Lee, Euntaek, Jérémy Pruvost, Xing He, Ramakanth Munipalli, и Laurent Pilon. «Design tool and guidelines for outdoor photobioreactors». *Chemical Engineering Science* 106 (1 март 2014 г.): 18–29. https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.11.014.

118. Acién Fernández, F. G., J. M. Fernández Sevilla, J. A. Sánchez Pérez, E. Molina Grima, и Y. Chisti. «Airlift-Driven External-Loop Tubular Photobioreactors for Outdoor Production of Microalgae: Assessment of Design and Performance». *Chemical Engineering Science* 56, вып. 8 (1 апрель 2001 г.): 2721–32. https://doi.org/10.1016/S0009-2509(00)00521-2.

119. Harel, Moti, и Allen R. Place. «Heterotrophic Production of Marine Algae for Aquaculture». *Handbook of Microalgal Culture*, 1 январь 2003 г., 513–24.

120. Shen, Ying, W. Yuan, Z.J. Pei, Q. Wu, и E. Mao. «Microalgae Mass Production Methods». *Transactions of the ASABE* 52 (1 июль 2009 г.): 1275–87. https://doi.org/10.13031/2013.27771.

121. Chini Zittelli, Graziella, Natascia Biondi, Liliana Rodolfi, и Mario Tredici. «Photobioreactors for Mass Production of Microalgae». В *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 225–66, 2013. https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch13.

122. Pruvost, J., F. Le Borgne, A. Artu, и J. Legrand. «Development of a Thin-Film Solar Photobioreactor with High Biomass Volumetric Productivity (AlgoFilm©) Based on Process Intensification Principles». *Algal Research* 21 (1 январь 2017 г.): 120–37. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.012.

123. Ullmann, Jörg, и Daniel Grimm. «Algae and Their Potential for a Future Bioeconomy, Landless Food Production, and the Socio-Economic Impact of an Algae Industry». *Organic Agriculture* 11, вып. 2 (1 июнь 2021 г.): 261–67. https://doi.org/10.1007/s13165-020-00337-9.

124. Kumar, Kanhaiya, Sanjiv K. Mishra, Anupama Shrivastav, Min S. Park, и Ji-Won Yang. «Recent Trends in the Mass Cultivation of Algae in Raceway Ponds». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 51, вып. C (2015 г.): 875–85.

125. Sun, Ning, Richard L. Skaggs, Mark S. Wigmosta, André M. Coleman, Michael H. Huesemann, и Scott J. Edmundson. «Growth Modeling to Evaluate Alternative Cultivation Strategies to Enhance National Microalgal Biomass Production». *Algal Research* 49 (1 август 2020 г.): 101939. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101939.

126. Viswanaathan, Shashirekha, Pitchurajan Krishna Perumal, и Seshadri Sundaram. «Integrated Approach for Carbon Sequestration and Wastewater Treatment Using Algal–Bacterial Consortia: Opportunities and Challenges». *Sustainability* 14, вып. 3 (январь 2022 г.): 1075. https://doi.org/10.3390/su14031075.

127. Tredici, Mario, Graziella Chini Zittelli, и Liliana Rodolfi. «Photobioreactors», 2010. https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib479.

128. Sierra, E., Gabriel Acien, J. Fernández, J. Garcia, Cynthia González-López, и Emilio Molina-Grima. «Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae». *Chemical Engineering Journal* 138 (1 май 2008 г.): 136–47. https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.06.004.

# 5. ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ МАЛО- И БЕЗОТХОДНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ

Коммерческие исследования водорослей активно проводились в области биоремедиации и агробиотехнологии , а сейчас они связаны с малоотходными и безотходными технологиями в биоэнергетике [1-5]. Это особенно характерно для таких стран, как Австралия, США, Таиланд, Тайвань и Мексика, где она возникла и развивалась. Это объясняется тем, что биологи этих стран разбираются в биологии и экологии крупномасштабных культур водорослей, а также в проектировании систем крупномасштабных культур водорослей и методов сбора водорослей, что важно для разработки и использования высокопродуктивных культур водорослей для получения ценных метаболитов при производстве биотоплива [6,7].

Биомасса водорослей представляет собой привлекательное сырье для производства биотоплива. Большинство видов микроводоросли являются миксотрофами, что позволяет их использовать одновременно и как источник энергии, и как очиститель сточных вод [8].

Создание и развитие малоотходных технологий основывается на рациональном использовании сырья и энергии чтобы производство было малозатратным, экономически выгодным с минимальным воздействием на окружающую среду [9]. Например мало- и безотходные технологии позволяют одновременно очищать сточные и одновременно производить биомассу , которая впоследствии может быть использована как сырье для получения биотоплива [10-13].

Многочисленные исследования показали потенциал культивирования маслянистых микроводорослей в сточных водах для производства биодизеля, где микроводоросли продемонстрировали значительную эффективность в удалении загрязняющих веществ из сточных вод и способность собирать липиды в организме клетки [14,15]. Микроводоросли можно культивировать как в городских, так и в промышленных сточных водах, например, с заводов по производству каучука и пальмового масла и текстильной промышленности, а также в

крахмальных сточных водах, содержащих тяжелые металлы[16,17]. Было установлено что, *Choleralla* sp., удаляет 75% химической потребности в кислороде (ХПК) текстильных сточных вод при накоплении 20% липидов в сухом весе клеток [18]. В другом исследовании при использовании *Botryococcus* sp. для обработки бытовых сточных вод показано, что микроводоросли способны удалять 64,5, 89,8 и 67,9% общего азота, общего фосфора и общего органического углерода соответственно, а также способны накапливать до 61,7% масс. /масс. липидов сухих клеток [19].

Большое количество исследований показало, что питательные вещества в сточных водах рыбоводческих хозяйств подходят для выращивания биомассы водорослей, пригодной для производства биодизеля [20-23], тогда как *Chlamydomonas reinhardtii* обладает наиболее подходящими свойствами для биодизельного топлива [24]. Кроме того, удаление эндокринных разрушителей, группы вызывающих тревогу новых загрязнителей современного мира, которые могут оказывать негативное влияние на здоровье человека, также может быть достигнуто за счет культивирования микроводорослей [26]. В ряде исследований изучалась возможность интеграции нескольких различных процессов, таких как очистка биогаза и очистка сточных вод с помощью микроводорослей. Например, культивирование *Chlorella* spp. в городских сточных водах не только улучшил биогаз до более чем 80% содержания аммиака, но также успешно удалило более 80% ХПК и более 70% общего азота и общего фосфора из сточных вод [27,28]. При культивировании в сточных водах свиней штамма Scenedesmus spp., также было обнаружено, что содержание $CH_4$ в биогазе увеличилось до уровня выше 70%, при этом эффективность удаления ХПК, общего азота и общего фосфора превысила 60 % [29].

Тем не менее, многие из исследований по-прежнему в основном осуществимы только в лабораторных масштабах, и необходима значительная работа, чтобы довести практику до промышленного уровня. Кроме того, несбалансированный профиль питательных веществ, такой как дефицит питательных веществ и токсичность из-за аммиака и высокая концентрация взвешенных твердых частиц в сточных водах, может

препятствовать нормальному росту водорослей и продуктивности липидов [30-33]. Поэтому перед культивированием микроводорослей сточные воды должны быть предварительно обработаны.




Рис. 1. Схема безотходной технологии получения водорослевой биомассы и биодизеля на основе микроводорослей [34].

Как показано на Рисунке 1, такие стратегии, как культивирование микроводорослей в сочетании с аквафермой, одновременное производство биодизеля с другими **продуктами с добавленной стоимостью** и интеграция культивирования микроводорослей с другими видами обработки, такими как повышение качества биогаза и очистка сточных вод, могут оказаться эффективными способами снижения производственных затрат [35]. Тем не менее, многие аспекты еще предстоит должным образом оценить и включить в анализ стоимости процесса, такие как: 1) общее влияние симбиоза микроводорослей и водных животных на рост как микроводорослей, так и водных организмов с учетом риска чрезмерного потребления микроводорослей [36]; воздействие токсичных соединений, продуцируемых микроводорослями, на

среду аквакультуры [37]; 2) важность производимых ВАП и стоимость их извлечения; 3) полностью оптимизированный уровень производительности анаэробного метантенка-автотрофного культивирования микроводорослей; и 4) влияние токсичных и вредных отходов, присутствующих в сточных водах, на способность микроводорослей к культивированию и накоплению липидов и качество производимого биодизеля

Поскольку для систем очистки сточных вод, содержащих микроводоросли, требуется значительное пространство, предпринимаются усилия по разработке систем очистки сточных вод, основанных на использовании супер концентрированных культур водорослей [38-40]. Это оказалось очень эффективным для удаления N и P за очень короткие промежутки времени, т.е. менее 1 часа.

Водорослевые системы могут очищать человеческие сточные, отходы животноводства, агропромышленные отходы и промышленных отходов. Кроме того, микроводорослевые системы для обработки других отходов, таких как стоки свиноводства, стоки пищевой промышленности фабрики и другие сельскохозяйственные отходы. Кроме того, разрабатываются системы на основе водорослей для удаления токсичных минералов, таких как свинец, кадмий, ртуть, скандий, олово, мышьяк и бром [41-43].

Технология и биотехнология массового культивирования микроводорослей широко обсуждались. Водорослевые системы традиционно использовались в качестве третичного процесса. Они были предложены в качестве потенциальной системы вторичной обработки [44-46].

В процессе третичной очистки удаляются все органические ионы. Это может быть достигнуто биологически или химически. Биологическая третичная очистка, по-видимому, дает хорошие результаты по сравнению с химическими процессами, которые, как правило, слишком дороги, чтобы их можно было применять в большинстве мест, и которые могут привести к вторичному загрязнению [47-49]. Однако каждый дополнительный этап очистки сточных вод значительно увеличивает общую стоимость. Относительная стоимость лечения удваивается на каждый дополнительный этап после основного лечения [50,51].

Таким образом, полный третичный процесс, направленный на удаление аммиака, нитратов и фосфатов, будет примерно в четыре раза дороже, чем первичная очистка. Культуры микроводорослей предлагают элегантное решение для третичной и пятеричной обработки благодаря способности микроводорослей использовать неорганический азот и фосфор для своего роста [52]. А также их способность удалять тяжелые металлы, а также некоторые токсичные органические соединения, поэтому не приводит к вторичному загрязнению. Среди полезных характеристик они производят кислород, обладают дезинфицирующим эффектом за счет повышения pH в процессе фотосинтеза [53,54].

Водоросли могут использоваться при очистке сточных вод для различных целей, некоторые из которых используются для удаления колиформных бактерий, снижения как химической, так и биохимической потребности в кислороде, удаления азота и/или фосфора, а также для удаления тяжелых металлов, а биомасса полученная при этом может быть хорошим сырьем для получения различного вида топлива [55,56].

### 5.1. Утилизация $CO_2$ фототрофными микроорганизмами

Фототрофные микроорганизмы по сравнению с растениями обладают наилучшей способностью улавливать $CO_2$ и превращать его таким образом в свою биомассу, что может быть использовано для его утилизации или уменьшения концентрации в атмосферном воздухе с одновременным получением полезной биомассы продуцента липидов [57]. При этом усвоение $CO_2$ разными видами цианобактерий может быть различным, и данный факт несомненно требует поиска перспективных культур цианобактерий с высоким потенциал усвоения углекислого газа для применения в безотходных технологиях [58-60]. Обогащение же среды углекислым газом необходимое для обеспечения культуры источником углерода требует тщательного подбора концентрации $CO_2$, оптимальных для их роста, поскольку с одной стороны, $CO_2$ при культивировании не должен достигать верхней концентрации, вызывающей ингибирование роста клеток, а с другой стороны, ее уровень никогда не должен опускаться ниже минимальной

концентрации, ограничивающей рост культуры. Эти верхние и нижние пределы концентрации $CO_2$ различаются у разных штаммов и еще недостаточно изучены [61-65].

Для изучения способности поглощения углекислого газа штаммами цианобактерий –продуцентами ЖК, нами проведен сравнительный анализ показателей скорости роста клеток у коллекционных штаммов цианобактерий [66]: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201, *Synechococcus elongatus* 7942 под влиянием различных концентраций $CO_2$.

Культуры исследуемых штаммов цианобактерий сравнивали прежде всего по их продуктивности. Для этого клетки цианобактерий выращивали в колбах в непрерывном режиме при искусственном освещении с интенсивностью света 300 мкмоль/м$^2$/сек и аэрацией газовоздушной смесью, содержащей 5 %, 10%, 15%, 20% $CO_2$ в течении 8 суток, в контрольном варианте биомасса цианобактерий аэрировалась обычной воздушной смесью, с содержанием углекислого газа – 0,03%. Учитывая, тот факт, что подача углекислого газа значительно сдвигает кислотно-щелочное равновесие питательной среды, на протяжении всего эксперимента проводили анализ изменения уровня pH и восстанавливали его уровень до контрольных величин. Продуктивность цианобактерий оценивалась по изменению оптической плотности клеток, измерение данного показателя проводилось через каждые 24 часа. Начальная оптическая плотность во всех вариантах опыта и контроля составляла $ОП_{720}$ = 0,03. Согласно полученным результатам, насыщение среды углекислым газом в целом значительно ускорило рост клеток цианобактерий, однако, как и предполагалось, наблюдалась видоспецифичность отклика цианобактерий на различные концентрации углерода.

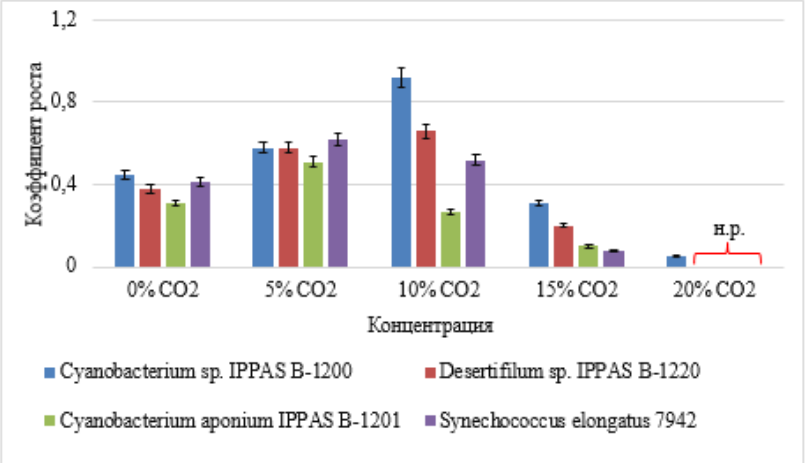
Так, сравнительно быстрый рост с первого дня культивирования наблюдался у штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Коэффициент скорости роста 0,92 для данной культуры зафиксирован на 6 сутки эксперимента при концентрации 10 % $CO_2$. Для штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 максимальная скорость роста среди всех вариантов опыта наблюдалась также при обогащении среды 10% $CO_2$.

Увеличение численности клеток для двух других штаммов *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201 и *Synechococcus elongatus* характеризовалось более низкой скоростью по сравнению с предыдущими штаммами. При этом концентрация $CO_2$ оптимальная для их роста составило 5 %. Коэффициенты скорости роста для них при данной концентрации $CO_2$ составили 0,51 – 0,62 соответственно. Расчетные данные коэффициентов скорости роста для цианобактерий представлены на рисунке 2.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о имеющихся различиях в отношении к $CO_2$ исследованных штаммов цианобактерий. Известно, что толерантность цианобактерий к высоким концентрациям $CO_2$ у устойчивых видов может быть связана как с генетически заложенными способностями осуществлять фотосинтез в условиях повышенных концентраций $CO_2$, так и с изменениями метаболизма в условиях физиологической адаптации [66-70]. Приводятся данные о том, что увеличение концентрации $CO_2$ до 5-15% при различных условиях освещения положительно влияет на скорость роста фототрофов и увеличивает их продуктивность за счет фотохимических и нефотохимических изменений в фотосинтетическом аппарате, приводящее к торможению фотоингибирования, следствием чего является производство большого объема биомассы [71-73]. Так, имеются сведения о высокой устойчивости к углекислому газу зеленых микроводорослей *Chlorella* sp., которая активно растет в условиях 40% $CO_2$ и *Scenedesmus* sp., который несмотря на то, что оптимальная концентрацией для его активного роста является 20% $CO_2$, выдерживает его значительно высокие концентрации до 80% [74]. Некоторые виды красных микроводорослей, как *Cyanidium caldarium* растут в условиях 100 % $CO_2$ [75]. Из цианобактерий имеются сведения о цианобактерии *Synechocystis*, которая росла в минеральной среде, снабженной газом, содержащим $CO_2$ в концентрации 20%. [76].

Однако, необходимо отметить, что для исследованных нами культур в условиях подачи значительно высокой концентрации углекислого газа в среде (80%) зафиксировано

сильное угнетение роста всех исследованных штаммов по сравнению с контролем [77-81]. Несмотря на незначительное увеличение численности клеток цианобактерий в первые сутки, через 3 суток наблюдалось наступление фазы отмирания клеточного цикла у всех штаммов. Известно, что фототрофные микроорганизмы несмотря на то, что нуждаются в источниках углерода, обладают различной толерантностью к углекислому газу. Несомненно, высокие концентрации $CO_2$ могут влиять на pH стромы хлоропластов и соответственно привести к ингибированию процесса фотосинтеза, а также вызывать различные другие негативные процессы, приводящие к прекращению роста и нередко к гибели культур [82-86].




*Сокращение*: н.р. – not detected

Рис. 2. Коэффициенты скорости роста клеток штаммов цианобактерий при разных концентрациях углекислого газа

Виды цианобактерий и микроводорослей, обладающие сложными механизмами поддержания гомеостаза внутриклеточного pH проявляя толерантность к $CO_2$ выдерживают сравнительно высокие концентрации углекислого газа [87-89]. Так, в исследованиях Yunes *и другие* 90] описано влияние $CO_2$ на гетероцистую цианобактерию *Anabaena*

*variabilis* ATCC 29413. Ими было отмечено значительное увеличение интенсивности роста данной культуры, при увеличение $CO_2$ (от 0,3 % до 5 %), при этом наблюдалось быстрое поглощение нитритов, независимо от того, были ли культуры инкубированы на свету или в темноте, и стимулировали эволюцию фотосинтетического $O_2$, активность глутамин синтетазы и активность нитрогеназы. Согласно полученным ими результатам, наличие $CO_2$ является важным фактором в контроле усвоения нитритов и согласуется с регулирующими взаимодействиями, включающими продукты усвоения $CO_2$ и азота. Положительное влияние возрастающих концентраций (до 5%) $CO_2$ на показатели роста микроводоросли *Chlorella vulgaris* отмечено и в исследованиях Goncalves *и другие* [91], где ими изучались кинетические параметры роста данной микроводоросли, выращенной в воздушных потоках, содержащих различные концентрации $CO_2$. Ими отмечено отсутствие фазы адаптации у микроводоросли, что свидетельствует об их устойчивости к высоким уровням $CO_2$. Аналогичные данные о положительном влиянии концентраций $CO_2$ – 6 % на удельную скорость роста *Spirulina* sp. и *Scenedesmus* obliquus были получены Morais итд. [92].

### 5.2. Применение сточной воды для культивирования цианобактерий

Учитывая резкое увеличение численности населения на земле и повышение уровня жизни необходимо отметить увеличение сточных вод на фоне дефицита пресной воды во всем мире. Так, в мире под воздействием анропогенной деятельности ежегодно в окружающую среду выбрасывается не менее 3 млрд. отходов, только некоторые из которых проходят повторную обработку. Например в одной Индии количество отходов, выбрасываемых в год, составляет 300 млн тонн, и со временем оно только увеличивается. В одной только столице Индии количество сточных вод, выливаемых во внешнюю среду, составляет около 40 млрд литров, и только меньше половины ее подвержено очистке и рециркуляции. В подавляющем большинстве стран, особенно в Китае, большая часть сточных вод образуемых из бытовых, муниципальных,

сельскохозяйственных и промышленных источников выливаются в окружающую среду без достаточной полноценной очистки [93-98].

Способность цианобактерий к росту на среде богатой органическим углеродом и неорганическим азотом и фосфором позволяет рассматривать возможность использования промышленных и бытовых сточных вод в качестве питательной среды с целью удешевления технологии их культивирования. При этом учитывая потенциал этих объектов в очистке загрязненных сточных вод, необходимо отметить о возможных больших перспективах мало- и безотходных технологий биоремедиации загрязненной воды с попутным получением их полезной биомассы. Они могут выращиватся в специальных природных и искусственных прудах при очистке промышленных и бытовых сточных вод и использоваться в части системы очистки, состоящей из нескольких этапов. Так, цианобактерии характеризуются способностью окислять нефтяные компоненты, сложные органические соединения и накапливать ионы металлов, например Zn, Co и Cu [99-101]. Их большой потенциал в очистке от различных металлов обусловлен содержанием в их клетках различных функциональных групп, таких как карбоксильные, гидроксильные, сульфатные и другие заряженные группы, важные для связывания металлов. Так приводятся сведения о биосорбции цинка и никеля штаммами спирулины *Spirulina indica, Spirulina maxima* и *Spirulina platensis* [102, 103]. Кроме того, известны большие возможности цианобактерий в удалении питательных веществ из сточных вод, богатых азотистыми и фосфорными соединениями. Способность удалять азотистые и фосфатные ионы из сточных вод наблюдалась у таких цианобактерий, как *Oscillatoria, Phormidium, Aphanocapsa* и *Westiellopsi*s [104].

В естественной среде многие цианобактерии образуют симбиотические ассоциации с другими аэробными или анаэробными микроорганизмами. Интересно отметить, что цианобактериальные маты, включающие представителей родов

*Oscillatoria, Synechocystis* и *Pleurocapsa*, как было показано, способствуют деградации углеводородов, присутствующих в нефти. При этом, несмотря на то что цианобактерии не несут прямой ответственности за деградацию углеводородов, они облегчают процесс деградации, обеспечивая кислородом и питательными веществами связанных с ними нефтедеструктивных бактерий [105-110]. Консорциум, состоящий из *Phormidium, Oscillatoria, Chroococcus* и бактерии, разлагающей нефть, *Burkholderia cepacia*, был успешно разработан и использован для эффективного разложения нефтяных соединений [111-113].

Способность цианобактерий расти на загрязненных сточных водах позволяет использовать их в мало- и безотходных технологиях, предусматривающих одновременное проведение очистки воды с паралельным получением биомассы культуры, обладающих большим потенциалом в получении биодизеля [114]. Согласно общемировым тенденциям развития биотехнологии, такие мало- и безотходные стратегии на сегодняшний день являются одними из важных трендов, поскольку отсутствие отходов снижает экологические нагрузки на окружающую среду и повышает рентабельность любой технологии [115-117].

Кроме того, необходимо отметить о высокой фотосинтетической активности цианобактерии, благодаря которому массовое их культивирование способно эффективно снизить выбросы углекислого газа в атмосферу и, таким образом, уменьшить влияние глобального потепления, внося немаловажный вклад в охрану природной среды и поддержание экологического баланса. В ряде исследований было отмечено, что цианобактерии могут быть полезны для очистки загрязненных вод, они способны очищать сточные воды, производимые на сахарных, кожевенных заводах, целлюлозно-бумажной и текстильной промышленностей [118-121]. Некоторые цианобактерий *Oscillatoria, Phormidium, Synechocystis* были хорошо изучены при очистке от различных загрязняющих веществ, таких как тяжелые металлы, пестициды,

лигнин и красители, выделяемые в промышленных сточных водах. Возможности цианобактерии в восстановлении сточных вод, в очистке воздуха от $CO_2$ могут быть интегрированы попутным получением их биомассы с целью производства биотоплива [122-124]. Это связано с тем, что цианобактерии могут обладать высоким уровнем накопления биомассы, липидной продуктивностью (до 20-40 %) и богатым составом получаемых жирных кислот [125-127]. При этом необходимо отметить, что качественный состав жирных кислот цианобактерии достаточно перспективен для получения биодизеля. Так, цианобактерий характеризуются наличием насыщенных и мононенасыщенных ЖК со средней длиной цепи от С14 до С18 [128-130]. Высокое содержание сложных эфиров насыщенных жирных кислот приводит к увеличению цетанового числа, а достаточное количество сложных эфиров ненасыщенных жирных кислот, например, сложного эфира олеиновой кислоты, значительно улучшает текучесть свойств биотоплива при более низких температурах [131]. Исследовательские работы в этом направлении интенсивно проводятся на цианобактериях родов *Synechocystis, Desertifilum, Synechococcus* [132-134]. В настоящее время, из-за высокой фотосинтетической эффективности и продуктивности биомассы, цианобактерия *Synechocystis* известна как биотопливное сырье с высоким потенциалом. Чтобы преодолеть некоторые существующие ограничения во время культивирования и улучшить биомассу цианобактерии, важно решить проблемы возникающие в выборе штаммов, выращивании, сборе и экстракции липидов [135].

В исследовательских работах сточные воды используются для выращивания цианобактерий путем частичного либо прямого замещения питательных сред. Bolatkhan и другие (2019) провели исследовательскую работу в применении комунальной сточной воды для культивирования штаммов цианобактерий получая возможность развития биоэнергетикой отрасли и экологически чистых технологии ремедиации окружающей среды [136]. Ими изучено влияние различных концентраций

углекислого газа и сточных вод на рост цианобактерий и определены их возможности в процессах очистки сточных вод. Установлено, что оптимальная концентрация $CO_2$ для выращивания цианобактерий *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 составляет 10%. Показано, что выращивание *Cyanobacterium* sp. IPPASB-1200 на сточной воде снижает концентрацию органических загрязняющих веществ и, соответственно, улучшает физико-химические свойства воды. Процент очистки выбранных загрязняющих веществ при этом составил 68-100%. Полученная при этом биомасса цианобактерий характеризовалась значительно высоким содержанием липидов (22 %). При этом качественный и количественный состав жирных кислот исследованных штаммов был наиболее подходящим для получения биодизеля. Безусловно, разработка таких технологий позволит развивать безотходные технологии, переработки жидких и воздушных отходов в энергетические ресурсы что сэкономит сырье и энергию и, в свою очередь, снизит образование отходов.

В исследовании Dimitar и другие, одноклеточный, нитевидный штамм *Dolichospermum affini* был выращен на среде BG-11, модифицированной сточной городской водой, содержащей шесть различных концентрации нитрата ($NaNO_3$) и фосфата ($K_2HPO_4$) [137]. Была определена молекулярная характеристика штаммов *D.affin* и норма липидного выхода составило 18,10%. Клетки, выросшие в сточных водах, имели более высокую активность по накоплению липидов по сравнению с другими средами. В исследовании Gulfem Soydemir (2015) были исследованы смешанные культуры цианобактерий, выращенные в очищенных бытовых сточных водах. Общий липидный выход смешанных культур составил 26,2% ± 0,6 по массе сухой биомассы. Анализ газовой хроматографии показал, что по состав FAME в основном состоит из метиловых эфиров пальмитиновой, пальмитолевой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот. Данное исследование свидетельствует о том, что очищенные бытовые сточные воды, могут быть благоприятной и устойчивой средой для

цианобактерий, для выращивания в качестве биодизельного сырья [138].

Blazina и ее соавторами (2019) изучена возможность цианобактерий *Synechococcus* sp. MK568070 в биоремедиации сточной воды нефтеперерабатывающего завода и определен ее потенциал в производстве биомассы и липидов. Согласно полученным ими данным, несмотря на существующую зависимость продуктивности биомассы от источника питательных веществ, их концентрации, солености и добавление $CO_2$, в целом наблюдается положительная корреляция увеличения выхода биомассы (767 мг сухой массы/л) и накопления липидов (21,4%) на фоне очистки сточной воды. Возможность накопления липидов за счет функционального фотосинтеза даже при минимальной концентрации питательных веществ, в условиях сточной воды и избытка промышленного $CO_2$ несомненно предопределяет перспективность штамма *Synechococcus* sp. (MK568070) для промышленного производства биодизеля и очистки сточных вод [139].

Kamilya и другие (2006) оценили потенциал удаления источников азота и фосфора из сточной воды культурами цианобактерий *Spirulina platensis* и *Nostoc muscorum*. Так, ими установлено что за 7 дней культивирования удаление биомассой *N. muscorum* $NH_4$, $NO_2$, $NO_3$ и $PO_4$ составило 83,6, 44,2, 14,17 и 41,79% соответственно, в то время как эти показатели для *S. platensis* были значительно выше и составили 47,76% соответственно. Высокий потенциал роста данных культур на сточной воде и их возможности в очистке предопределяют перспективы их дальнейшего использования в качестве источника биотоплива [140].

Значительное увеличение продуктивности цианобактерий на сточной воде показано Mostafa и другие Согласно их данным, выход биомассы *Nostoc humifusum* достиг максимальных значений (572.80 мг сухой массы/л) при культивировании на сточной воде без какой-либо обработки и добавок, по сравнению с контрольным значением (400 мг сухой массы/л), а для *Phormedium fragile* эти показатели составили в опыте -

156.16, в контроле - 103.6 [141, 142]. Перспективность цианобактерии *Nostoc linkkia* в очистке сточной воды от азотсодержащих, фосфорсодержащих соединений и поверхностно-активных веществ с одновременным получением липид содержащей биомассы отмечена в работе El-Enany и другие [143].

Сочетание процессов очистки воды с производством биомассы микроводорослей позволит значительно повысить экологическую и экономическую эффективность производства биомассы продуцентов биодизеля. Поэтому использование сточных вод рассматривается как перспективная альтернатива использованию синтетических сред со значительным снижением затрат на культивирование за счет их высокой доступности и наличия питательных веществ, необходимых для роста [144-146]. Это особенно важно при масштабировании процесса производства биомассы цианобактерий. Поэтому разработка эффективных подходов к культивированию цианобактерии, наряду с отбором высокоэффективных штаммов и изучением их метаболических возможностей, является важным шагом на пути разработки экономически обоснованной технологии получения биодизельного топлива из биомассы цианобактерий [147].

Нашей исследовательской группой проведено исследование которое включало культивирование штаммов цианобактерий при различных концентрациях сточных вод для получения жирных кислот и липидов, с целью изучения влияния сточной воды на рост исследуемых цианобактерий и определение ее концентрации, оптимальной для роста культур, с целью удешевления используемой питательной среды и как следствие снижение себестоимости получаемого биодизеля. В нашем эксперименте мы использовали коммунально-бытовые сточные воды накопителя «Сорбулак». Накопитель «Сорбулак» представляет естественную замкнутую котловину, расположенную в северо-западной части города Алматы, используемую для сбора, доочистки и хранения коммунально-бытовых стоков города. Для оценки влияния сточных вод на

показатели роста цианобактерий были приготовлены 4 варианта опытных образца, содержащие предварительно отфильрованную и простерилизованную сточную воду и питательную среду в различных соотношениях, и в качестве контроля использовали среду BG-11.

По результатам предыдущего эксперимента для дальнейших исследований отобраны 3 штамма, отличившиеся наиболее высокими показателями роста в условиях высоких концентраций $CO_2$. Так, исследуемые культуры цианобактерий выращивали на пяти различных средах (см. Материалы и методы) с начальной плотностью $ОП_{720}$ = 0,03 ед. в течение 14 суток (рисунок 3). $CO_2$ добавляли на основании результатов предварительных исследований. Во всех вариантах для штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 и *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 – 10% концентрация $CO_2$ в воздухе составила 10% и для *Cyanobacterium* aponium IPPAS B-1201 – 5%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сточные воды в определённом соотношении могут быть эффективно использованы в качестве питательных сред для накопления клеток цианобактерий с одновременным проведением ее биоремедиации.

В вариантах опыта №4 и №5 при соотношениях сточной воды к питательной среде 25:75 и 50:50 наблюдался активный рост всех исследуемых штаммов цианобактерий. Так, наибольшие показатели коэффициента скорости роста при этом наблюдались у штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и составляли в данных опытных вариантах 0,9 и 0,8 соответственно. Для штамма *Desertifilum* sp. IPPASB-1220 эти цифры были в пределах 0,7 и 0,6. Сравнительно меньшие показатели коэффициента скорости роста были отмечены для штамма *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201 – 6,5 и 5,7 соответственно. Увеличение в опытном образце сточной воды до 75 % значительно снизило рост клеток цианобактерий, как и в опытном варианте 2, где использовалась чистая сточная вода для их культивирования. Как известно, в сточных водах помимо биогенных элементов могут содержаться и различные токсины,

в том числе поверхностно-активные вещества, нефтепродукты и другие соединения, неизвестной природы, присутствие которых угнетает рост фототрофных микроорганизмов [148]. Поэтому разбавление сточной воды водой либо питательной средой с внесением питательных веществ несомненно положительно сказывается на росте цианобактерий.

Таким образом, соотношения сточной воды к питательной среде, наиболее оптимальные для роста исследованных цианобактерий были 25:75 и 50:50.

Установлено, что наиболее активный рост во всех опытных вариантах среди исследованных цианобактерий был характерен для *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200.

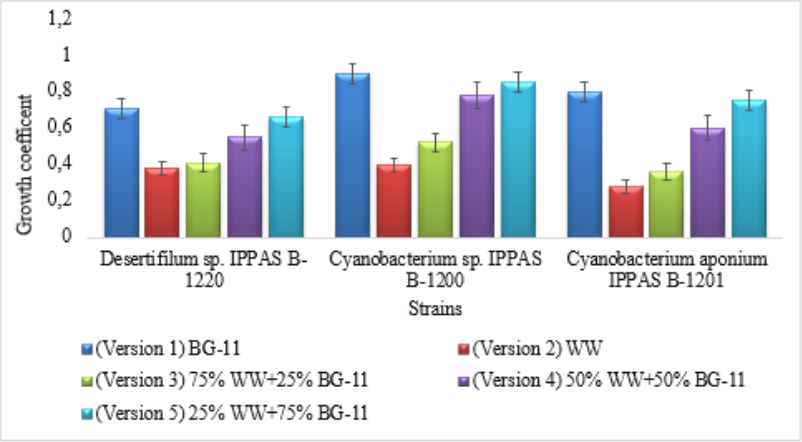



Рис. 3. Коэффициенты скорости роста цианобактерий при культивировании на сточной воде разбавленной питательной средой BG-11 в различном соотношении. Сокращение: СВ – сточные воды, BG-11 – среда BG-11.

С целью определения способности цианобактерий к биоремедиации данной сточной воды был проанализирован физико-химический состав воды до и после культивирования в ней наиболее активного среди протестированных культур, штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 в опытных вариантах

2 (сточная вода) и 4 (сточная вода и питательная среда 50:50) (Таблица 1).

Таблица 1- Физико-химический состав сточной воды до и после культивирования в ней цианобактерий *Cyanobacterium* sp. IPPASB-1200.

| Определяемая характеристика | Единица измерения | Сточная вода | | | 50ПС+50СВ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | До культивирования | После культивирования | Очистка, % | До культивирования | После культивирования | Очистка, % |
| pH | - | 7,8 | 7,4 | 76% | 7,2 | 7,0 | 100% |
| Взвешенные в-ва | мг/л | 58 | 14,64 | 73% | 41 | 2,7 | 95% |
| Запах | баллы | 5 | 1,5 | 80% | 3,9 | 0,1 | 95% |
| БПК5 | мг/л | 56 | 12,28 | 77% | 43 | 1,2 | 100% |
| ХПК | мг $O_2$/л | 33,5 | 8,5 | 86% | 31,5 | 7,9 | 92% |
| Окисляемость | мг O2/л | 38 | 7,6 | 85% | 24 | 0,01 | 100% |
| Аммиак | мг/л | 14,9 | 2,7 | 76% | 4,9 | 0,12 | 100% |
| Нитриты | мг/л | 0,65 | 0,15 | 79% | 0,9 | 0,04 | 100% |
| Нитраты | мг/л | 0,97 | 0,24 | 63% | 1,5 | 0,2 | 95% |
| Фосфаты | мг/л | 3,9 | 0,3 | 66% | 34,6 | 0,7 | 92% |
| Кальций | мг/л | 50,9 | 8,6 | 79% | 70,6 | 5,6 | 97% |
| Магний | мг/л | 14,81 | 3,9 | 69% | 44,5 | 2,6 | 95% |
| Хлориды | мг/л | 50,7 | 17,5 | 80% | 68 | 6,8 | 93% |
| Сульфаты | мг/л | 59,17 | 11,2 | 76% | 75,6 | 9,2 | 90% |
| Гидрокарбонаты | мг/л | 536,45 | 20,12 | 80% | 595 | 18,6 | 96% |
| Минерализация | мг/л | 540 | 95,3 | 74% | 760 | 86,3 | 100% |
| Железо | мг/л | 0,21 | 0,013 | 80% | 0,18 | 0,005 | 100% |
| Медь | мг/л | 0,008 | 0,005 | 75% | 0,0075 | 0,0006 | 100% |
| Цинк | мг/л | 0,07 | 0,021 | 70% | 0,043 | 0,002 | 100% |

Полученные результаты свидетельствуют о том, что культивирование цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPASB-1200 на сточных водах из накопителя снижает концентрацию органических загрязнений и улучшают физико-химические показатели воды на 68-100%, что свидетельствует о высокой перспективе использования сточной воды для культивирования штаммов цианобактерий с целью получения их биомассы и одновременным проведением очистки воды от загрязнений.

При этом необходимо отметить, что в опытном варианте 2, содержащей только сточную воду, несмотря на значительное снижение коэффициента скорости роста исследуемого штамма, физико-химический состав воды значительно улучшился, процент очистки при этом составил 68-80%. В опытном

варианте 4 наблюдалось полное удаление биогенных элементов и улучшение качества воды. Безусловно, можно утверждать, что дополнительное добавление питательной среды в сточную воду способствует быстрому росту культуры и соответственно ускорению процессов поглощения различных соединений воды клетками цианобактерии [149-151]. Увеличение значения pH происходящее в ходе фотосинтеза в результате нарушения бикарбонатно-карбонатного равновесия компенсируется внесением диокисда углерода, что позволяет избежать угнетения роста цианобактерии [152].

В литературе имеется не мало сведений о роли цианобактерий в процессах очистки различных сточных вод, в том числе комунально-бытовых отходов. Так приводятся сведения о возможностях цианобактрии *Nostoc linckia* в очистке сточных вод, где оптимальным соотношением сточной воды и среды для эффективной очистки и накопления биомассы было 50:50 [153]. Помимо очистки от азот- и фосфорсодержащих соединений, показана возможность применения цианобактерий и микроводорослей для очистки сточных вод от поверхностно активных веществ с одновременным получением липидсодержащей биомассы. Так по некоторым данным, микроводоросли *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorococcum humicola, B. braunii и Chlorella* sp., обладают высокой специфической скоростью роста 0,354–0,501 $сут^{-1}$ и высоким содержанием липидов (21,54–41,98% по сухому веществу) при культивировании на сточных водах с подобными загрязнителями [154]. При этом нередко приводятся сведения о том, что рост на сточной воде фототрофных микроорганизмов значительно активнее нежели в контроле. Однако это конечно же связано с составом используемой сточной воды. Так, использование сточной воды загрязненной органическими веществами позволило более чем в 3 раза повысить скорость роста клеток и продуктивность по биомассе у *Chlorella vulgaris* С-1 [155].

**Список использованных источников**

1. Fabris, Michele, Raffaela M. Abbriano, Mathieu Pernice, Donna L. Sutherland, Audrey S. Commault, Christopher C. Hall, Leen Labeeuw, и др. «Emerging Technologies in Algal Biotechnology: Toward the Establishment of a Sustainable, Algae-Based Bioeconomy». *Frontiers in Plant Science* 11 (2020 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00279.

2. Ahmad, Ashfaq, Fawzi Banat, Habiba Alsafar, и Shadi W. Hasan. «Algae Biotechnology for Industrial Wastewater Treatment, Bioenergy Production, and High-Value Bioproducts». *The Science of the Total Environment* 806, вып. Pt 2 (1 февраль 2022 г.): 150585. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150585.

3. Roberts, David A., Rocky de Nys, и Nicholas A. Paul. «The Effect of CO2 on Algal Growth in Industrial Waste Water for Bioenergy and Bioremediation Applications». PLOS ONE 8, вып. 11 (2013 г.): e81631. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081631.

4. Khan, Muhammad Imran, Jin Hyuk Shin, и Jong Deog Kim. «The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products». Microbial Cell Factories 17, вып. 1 (5 март 2018 г.): 36. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x.

5. Sowby, Robert B., и Annelise Capener. «Reducing Carbon Emissions through Water Conservation: An Analysis of 10 Major U.S. Cities». Energy Nexus, 16 июнь 2022 г., 100094. https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100094.

6. Abdel-Raouf, N., A. A. Al-Homaidan, и I. B. M. Ibraheem. «Microalgae and Wastewater Treatment». Saudi Journal of Biological Sciences 19, вып. 3 (1 июль 2012 г.): 257–75. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005.

7. Araújo, Rita, Fatima Vázquez Calderón, Javier Sánchez López, Isabel Costa Azevedo, Annette Bruhn, Silvia Fluch, Manuel Garcia Tasende, и др. «Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy». Frontiers in Marine Science 7 (2021 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2020.626389.

8. Benedetti, Manuel, Valeria Vecchi, Simone Barera, и Luca Dall'Osto. «Biomass from microalgae: the potential of domestication

towards sustainable biofactories». Microbial Cell Factories 17, вып. 1 (10 ноябрь 2018 г.): 173. https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3.

9. Singh, Poonam, Imran Pancha, Anjali Singh, Khushal Mehta, и Kiran Toppo. «Chapter 4 - Wastewater Grown Microalgae Feedstock for Biodiesel Production». В Waste and Biodiesel, под редакцией Bhaskar Singh и Abhishek Guldhe, 59–73. Elsevier, 2022. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823958-2.00009-4.

10. Bharathiraja, Dr.B., D. Yogendran, Ranjith Kumar.R, Manu Chakravarthy, и Palani Subramani. «Biofuels from sewage sludge- A review». International journal of chem tech research 6 (15 сентябрь 2014 г.): 4417–27.

11. Usmani, Zeba, Minaxi Sharma, Abhishek Kumar Awasthi, Nallusamy Sivakumar, Tiit Lukk, Lorenzo Pecoraro, Vijay Kumar Thakur, Dave Roberts, John Newbold, и Vijai Kumar Gupta. «Bioprocessing of Waste Biomass for Sustainable Product Development and Minimizing Environmental Impact». Bioresource Technology 322 (1 февраль 2021 г.): 124548. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124548.

12. Nair, Lakshana G, Komal Agrawal, и Pradeep Verma. «An Overview of Sustainable Approaches for Bioenergy Production from Agro-Industrial Wastes». Energy Nexus 6 (16 июнь 2022 г.): 100086. https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100086.

13. Kukkonen, Petri, Pekka Knuuttila, и Pekka Jokela. Waste water treatment from a biomass-to-liquid process comprising synthesis gas production and integrated factory facility. United States US8591737B2, filed 18 июль 2008 г., и issued 26 ноябрь 2013 г. https://patents.google.com/patent/US8591737B2/en.

14. Deshmukh, Suchit, Ritunesh Kumar, и Kiran Bala. «Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions». Fuel Processing Technology 191 (12 май 2019 г.): 232–47. https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.03.013.

15. Udayan, Aswathy, Ashutosh Kumar Pandey, Ranjna Sirohi, Nidhin Sreekumar, Byoung-In Sang, Sung Jun Sim, Sang Hyoun Kim, и Ashok Pandey. «Production of Microalgae with High Lipid Content and Their Potential as Sources of Nutraceuticals». Phytochemistry Reviews, 23 январь 2022 г. https://doi.org/10.1007/s11101-021-09784-y.

16. Arutselvan, Chithirai, Ganesan Narchonai, Arivalagan Pugazhendhi, Harish kumar Seenivasan, Felix LewisOscar, и Nooruddin Thajuddin. «Phycoremediation of Textile and Tannery Industrial Effluents Using Microalgae and Their Consortium for Biodiesel Production». Journal of Cleaner Production, 12 июль 2022 г., 133100. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133100.

17. Rinna, Francesca, Silvia Buono, Iago Teles, Iracema Nascimento, Giovanni Sansone, и Carmela Barone. «Wastewater treatment by microalgae can generate high quality biodiesel feedstock». Journal of Water Process Engineering 18 (1 август 2017 г.): 144–49. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.06.006.

18. Enwereuzoh, Uzochukwu, Kevin Harding, и Michelle Low. «Microalgae cultivation using nutrients in fish farm effluent for biodiesel production». South African Journal of Chemical Engineering 37 (1 апрель 2021 г.). https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.03.007.

19. Enwereuzoh, Uzochukwu, Kevin Harding, и Michelle Low. «Fish farm effluent as a nutrient source for algae biomass cultivation». South African Journal of Science 117 (29 июль 2021 г.). https://doi.org/10.17159/sajs.2021/8694.

20. Enwereuzoh, Uzochukwu, Kevin Harding, и Michelle Low. «Characterization of Biodiesel Produced from Microalgae Grown on Fish Farm Wastewater». SN Applied Sciences 2, вып. 5 (26 апрель 2020 г.): 970. https://doi.org/10.1007/s42452-020-2770-8.

21. Sharma, Gulshan Kumar, Shakeel Ahmad Khan, Amit Kumar, Ittyamkandath Rashmi, Fayaz Ahmad Malla, и Gopal Lal Meena. Algal Biorefinery: A Synergetic Sustainable Solution to Wastewater Treatment and Biofuel Production. IntechOpen, 2022. https://doi.org/10.5772/intechopen.104762.

22. Bagchi, Sourav Kumar, Reeza Patnaik, и Ramasare Prasad. «Feasibility of Utilizing Wastewaters for Large-Scale Microalgal Cultivation and Biofuel Productions Using Hydrothermal Liquefaction Technique: A Comprehensive Review». Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 9 (2021 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.651138.

23. Ahmad, Ashfaq, Shadi W. Hassan, и Fawzi Banat. «An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: food security and circular economy». Bioengineered 13,

вып. 4 (1 апрель 2022 г.): 9521–47. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061148.

24. Karpagam, R., R. Preeti, B. Ashokkumar, и P. Varalakshmi. «Enhancement of Lipid Production and Fatty Acid Profiling in Chlamydomonas Reinhardtii, CC1010 for Biodiesel Production». Ecotoxicology and Environmental Safety, Green Technologies for Environmental Pollution Control and Prevention (Part 1), 121 (1 ноябрь 2015 г.): 253–57. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.015.

25. Antony, Sherly, Sham Antony, Sharrel Rebello, Sandhra George, Devika T. Biju, Reshmy R, Aravind Madhavan, и др. «Bioremediation of Endocrine Disrupting Chemicals- Advancements and Challenges». Environmental Research 213 (1 октябрь 2022 г.): 113509. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113509.

26. López-Sánchez, Anaid, Ana Laura Silva-Gálvez, Óscar Aguilar-Juárez, Carolina Senés-Guerrero, Danielle A. Orozco-Nunnelly, Danay Carrillo-Nieves, и Misael Sebastián Gradilla-Hernández. «Microalgae-Based Livestock Wastewater Treatment (MbWT) as a Circular Bioeconomy Approach: Enhancement of Biomass Productivity, Pollutant Removal and High-Value Compound Production». Journal of Environmental Management 308 (15 апрель 2022 г.): 114612. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114612.

27. Kumari, Preety, Anil Verma, Ravi Shankar, Lokendra Thakur, и Prasenjit Mondal. «Phycoremediation of wastewater by Chlorella Pyrenoidosa and utilization of its biomass for biogas production». Journal of Environmental Chemical Engineering 9 (1 декабрь 2020 г.): 104974. https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104974.

28. Cheng, J, и B Liu. «Swine wastewater treatment in anaerobic digesters with floating medium». Transactions of the ASAE 45 (1 май 2002 г.). https://doi.org/10.13031/2013.8842.

29. Rafa, Nazifa, Shams Forruque Ahmed, Irfan Anjum Badruddin, M. Mofijur, и Sarfaraz Kamangar. «Strategies to Produce Cost-Effective Third-Generation Biofuel From Microalgae». Frontiers in Energy Research 9 (2021 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2021.749968.

30. Reddy, M. Srikanth, Fatimah Yusoff, Sanjoy Banerjee, и Mohamed Shariff. «Microalgae as Sustainable Renewable Energy Feedstock for Biofuel Production». BioMed research international 2015 (22 март 2015 г.): 519513. https://doi.org/10.1155/2015/519513.

31. Karpagam, Rathinasamy, Kalimuthu Jawaharraj, и Ramasamy Gnanam. «Review on Integrated Biofuel Production from Microalgal Biomass through the Outset of Transesterification Route: A Cascade Approach for Sustainable Bioenergy». Science of The Total Environment 766 (20 апрель 2021 г.): 144236. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144236.

32. Vasistha, Shrasti, Anwesha Khanra, и Monika Prakash Rai. «Progress and Challenges in Biodiesel Production from Microalgae Feedstock». В Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment, под редакцией Md. Asraful Alam и Zhongming Wang, 323–45. Singapore: Springer, 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_14.

33. Mandotra, Sachin, Afreen Jan, Sunil Kumar, Pramod Ramteke, и Amrik Ahluwalia. «Integrated Approach for Bioremediation and Biofuel Production Using Algae», 145–60, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7665-8_10.

34. Castro-Muñoz, Roberto, и Octavio García-Depraect. «Membrane-Based Harvesting Processes for Microalgae and Their Valuable-Related Molecules: A Review». Membranes 11 (30 июль 2021 г.): 585. https://doi.org/10.3390/membranes11080585.

35. Jayaseelan, Merrylin, Mohamed Usman, Adishkumar Somanathan, Sivashanmugam Palani, Gunasekaran Muniappan, и Rajesh Banu. «Microalgal Production of Biofuels Integrated with Wastewater Treatment». Sustainability 13 (6 август 2021 г.): 8797. https://doi.org/10.3390/su13168797.

36. Han, Pei, Qian Lu, и Liangliang Fan. «A Review on the Use of Microalgae for Sustainable Aquaculture». Applied Sciences 9 (11 июнь 2019 г.): 2377. https://doi.org/10.3390/app9112377.

37. Fuentes, Juan Luis, Inés Garbayo, María Cuaresma, Zaida Montero, Manuel González-del-Valle, и Carlos Vílchez. «Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds». Marine Drugs 14, вып. 5 (май 2016 г.): 100. https://doi.org/10.3390/md14050100.

38. Plöhn, Martin, Olivia Spain, Sema Sirin, Mário Silva, Carlos Escudero, Laura Ferrando-Climent, Yagut Allahverdiyeva, и Christiane Funk. «Wastewater treatment by microalgae». Physiologia Plantarum 173 (1 апрель 2021 г.). https://doi.org/10.1111/ppl.13427.

39. Hwang, Jae-Hoon, Jared Church, Seung-Jin Lee, Jungsu Park, и Woo Lee. «Use of Microalgae for Advanced Wastewater Treatment and Sustainable Bioenergy Generation». Environmental Engineering Science 33 (3 август 2016 г.). https://doi.org/10.1089/ees.2016.0132.

40. Gupta, Prabuddha L., Seung-Mok Lee, и Hee-Jeong Choi. «Integration of Microalgal Cultivation System for Wastewater Remediation and Sustainable Biomass Production». World Journal of Microbiology & Biotechnology 32, вып. 8 (август 2016 г.): 139. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2090-8.

41. Posadas Olmos, Esther, Sonia Bochon, Mónica Coca, María García-González, Pedro García-Encina, и Raul Muñoz. «Microalgae-based agro-industrial wastewater treatment: a preliminary screening of biodegradability». Journal of Applied Phycology 26 (1 декабрь 2014 г.). https://doi.org/10.1007/s10811-014-0263-0.

42. Aljabri, Hareb, Probir Das, Shoyeb Khan, Mahmoud Thaher, и Mohammed Abdulquadir. «Treatment of Wastewaters by Microalgae and the Potential Applications of the Produced Biomass—A Review», 28 декабрь 2020 г. https://doi.org/10.3390/w13010027.

43. Yadav, Geetanjali, Sukanta K. Dash, и Ramkrishna Sen. «A Biorefinery for Valorization of Industrial Waste-Water and Flue Gas by Microalgae for Waste Mitigation, Carbon-Dioxide Sequestration and Algal Biomass Production». The Science of the Total Environment 688 (20 октябрь 2019 г.): 129–35. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.024.

44. McGinn, Patrick J., Kathryn E. Dickinson, Kyoung C. Park, Crystal G. Whitney, Scott P. MacQuarrie, Frank J. Black, Jean-Claude Frigon, Serge R. Guiot, и Stephen J. B. O'Leary. «Assessment of the Bioenergy and Bioremediation Potentials of the Microalga Scenedesmus Sp. AMDD Cultivated in Municipal Wastewater Effluent in Batch and Continuous Mode». Algal

Research 1, вып. 2 (1 октябрь 2012 г.): 155–65. https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.05.001.

45. Peter, Angela, Kuan Shiong Khoo, Chew Kit Wayne, Tau Ling, Shih-Hsin Ho, Jo-Shu Chang, и Pau-Loke Show. «Microalgae for biofuels, wastewater treatment and environmental monitoring». Environmental Chemistry Letters 19 (15 апрель 2021 г.). https://doi.org/10.1007/s10311-021-01219-6.

46. Randrianarison, Gilbert, и Muhammad Aqeel Ashraf. «Microalgae: a potential plant for energy production». Geology, Ecology, and Landscapes 1, вып. 2 (3 апрель 2017 г.): 104–20. https://doi.org/10.1080/24749508.2017.1332853.

47. Gerba, C. P., и I. L. Pepper. «Chapter 22 - Municipal Wastewater Treatment». В Environmental and Pollution Science (Third Edition), под редакцией Mark L. Brusseau, Ian L. Pepper, и Charles P. Gerba, 393–418. Academic Press, 2019. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814719-1.00022-7.

48. Byers, William, Glen Lindgren, Calvin Noling, и Dennis Peters. Industrial Water Management: A Systems Approach. John Wiley & Sons, 2010.

49. Samer, Mohamed. Biological and Chemical Wastewater Treatment Processes. Wastewater Treatment Engineering. IntechOpen, 2015. https://doi.org/10.5772/61250.

50. Maktabifard, Mojtaba, Ewa Zaborowska, и Jacek Makinia. «Achieving Energy Neutrality in Wastewater Treatment Plants through Energy Savings and Enhancing Renewable Energy Production». Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 17, вып. 4 (1 декабрь 2018 г.): 655–89. https://doi.org/10.1007/s11157-018-9478-x.

51. El-Sheekh, M., M. M. El-Dalatony, N. Thakur, Y. Zheng, и El-Sayed Salama. «Role of Microalgae and Cyanobacteria in Wastewater Treatment: Genetic Engineering and Omics Approaches». International Journal of Environmental Science and Technology 19, вып. 3 (1 март 2022 г.): 2173–94. https://doi.org/10.1007/s13762-021-03270-w.

52. Almomani, Fares, и Banu Ormeci. «Performance Of Chlorella Vulgaris, Neochloris Oleoabundans, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and

centrate». Ecological Engineering 95 (1 октябрь 2016 г.): 280–89. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.038.

53. Garbisu, Carlos, David Hall, и Juan Serra. «Removal of phosphate by foam- immobilized Phormidium laminosum in batch and continuous- flow bioreactors». Journal of Chemical Technology and Biotechnology 57 (24 апрель 2007 г.): 181–89. https://doi.org/10.1002/jctb.280570214.

54. Yan, An, Yamin Wang, Swee Ngin Tan, Mohamed Lokman Mohd Yusof, Subhadip Ghosh, и Zhong Chen. «Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land». Frontiers in Plant Science 11 (2020 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00359.

55. Ahmad, Farooq, A. Iftikhar, Ammanullah Ali, S.A. Shabbir, Abdul Wahid, Nazish mohy-u-din, и A. Rauf. «Removal of coliform bacteria from municipal wastewater by algae». Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences 51 (1 июнь 2014 г.): 129–38.

56. Dhanker, Raunak, Merwin Mathew, Kanchan Khatana, Vaidehi Vats, Ram Kumar, Dahms Hans-Uwe, и Jiang-Shiou Hwang. «Biological Approaches Integrating Algae and Bacteria for the Degradation of Wastewater Contaminants-A Review». Frontiers in Microbiology 12 (1 февраль 2022 г.): 801051. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.801051.

57. Daneshvar, Ehsan, Rebecca J. Wicker, Pau-Loke Show, и Amit Bhatnagar. «Biologically-Mediated Carbon Capture and Utilization by Microalgae towards Sustainable CO2 Biofixation and Biomass Valorization – A Review». Chemical Engineering Journal 427 (1 январь 2022 г.): 130884. https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130884.

58. Singh, Uday Bhan, и Amrik Ahluwalia. «Microalgae: A promising tool for carbon sequestration». Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 18 (1 январь 2013 г.). https://doi.org/10.1007/s11027-012-9393-3.

59. Sharp, Christine E., Sydney Urschel, Xiaoli Dong, Allyson L. Brady, Greg F. Slater, и Marc Strous. «Robust, High-Productivity Phototrophic Carbon Capture at High PH and Alkalinity Using Natural Microbial Communities». Biotechnology for Biofuels 10 (2017 г.): 84. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0769-1.

60. Singh, Rachana, Parul Parihar, Madhulika Singh, Andrzej Bajguz, Jitendra Kumar, Samiksha Singh, Vijay P. Singh, и Sheo M. Prasad. «Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects». Frontiers in Microbiology 8 (2017 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00515.

61. Barone, Giovanni, Damir Ferizović, Antonino Biundo, и Peter Lindblad. «Hints at the Applicability of Microalgae and Cyanobacteria for the Biodegradation of Plastics». Sustainability 12 (14 декабрь 2020 г.): 10449. https://doi.org/10.3390/su122410449.

62. Andrews, Fraser, Matthew Faulkner, Helen S. Toogood, и Nigel S. Scrutton. «Combinatorial use of environmental stresses and genetic engineering to increase ethanol titres in cyanobacteria». Biotechnology for Biofuels 14, вып. 1 (17 декабрь 2021 г.): 240. https://doi.org/10.1186/s13068-021-02091-w.

63. Bach, Lennart T., Nauzet Hernández-Hernández, Jan Taucher, Carsten Spisla, Claudia Sforna, Ulf Riebesell, и Javier Arístegui. «Effects of Elevated CO2 on a Natural Diatom Community in the Subtropical NE Atlantic». Frontiers in Marine Science 6 (2019 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2019.00075.

64. Morison, J. I. L., и D. W. Lawlor. «Interactions between Increasing CO2 Concentration and Temperature on Plant Growth». Plant, Cell & Environment 22, вып. 6 (1999 г.): 659–82. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00443.x.

65. Read «Managing Water Resources in the West Under Conditions of Climate Uncertainty: A Proceedings» at NAP.Edu. Просмотрено 15 июль 2022 г. https://doi.org/10.17226/1911.

66. Wang, Li, Liyuan Chen, Shihui Yang, и Xiaoming Tan. «Photosynthetic Conversion of Carbon Dioxide to Oleochemicals by Cyanobacteria: Recent Advances and Future Perspectives». Frontiers in Microbiology 11 (2020 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00634.

67. Mehta, Kanika, Damini Jaiswal, Monalisha Nayak, Charulata B. Prasannan, Pramod P. Wangikar, и Sanjeeva Srivastava. «Elevated Carbon Dioxide Levels Lead to Proteome-Wide Alterations for Optimal Growth of a Fast-Growing Cyanobacterium, Synechococcus Elongatus PCC 11801». Scientific Reports 9, вып. 1

(18 апрель 2019 г.): 6257. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42576-1.

68. Jiang, Hai-Bo, Wei-Yu Song, Hui-Min Cheng, и Bao-Sheng Qiu. «The Hypothetical Protein Ycf46 Is Involved in Regulation of CO2 Utilization in the Cyanobacterium Synechocystis Sp. PCC 6803». Planta 241, вып. 1 (январь 2015 г.): 145–55. https://doi.org/10.1007/s00425-014-2169-0.

69. Bao, Nanou, и Kunshan Gao. «Interactive Effects of Elevated CO2 Concentration and Light on the Picophytoplankton Synechococcus». Frontiers in Marine Science 8 (2021 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.634189.

70. Flamholz, Avi I, Eli Dugan, Cecilia Blikstad, Shmuel Gleizer, Roee Ben-Nissan, Shira Amram, Niv Antonovsky, и др. «Functional reconstitution of a bacterial CO2 concentrating mechanism in Escherichia coli». Под редакцией Manajit Hayer-Hartl, Christian S Hardtke, и Martin Casimir Jonikas. eLife 9 (21 октябрь 2020 г.): e59882. https://doi.org/10.7554/eLife.59882.

71. Papazi, Aikaterini, Pavlos Makridis, Pascal Divanach, и Kiriakos Kotzabasis. «Bioenergetic changes in the microalgal photosynthetic apparatus by extremely high CO2 concentrations induce an intense biomass production». Physiologia plantarum 132 (1 апрель 2008 г.): 338–49. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01015.x.

72. Abu-Ghosh, Said, Dror Fixler, Zvy Dubinsky, Alexei Solovchenko, Miriam Zigman, Yaron Yehoshua, и David Iluz. «Flashing light enhancement of photosynthesis and growth occurs when photochemistry and photoprotection are balanced in Dunaliella salina». European Journal of Phycology 50 (2 сентябрь 2015 г.). https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1069404.

73. Gerotto, Caterina, Alessandra Norici, и Mario Giordano. «Toward Enhanced Fixation of CO2 in Aquatic Biomass: Focus on Microalgae». Frontiers in Energy Research 8 (2020 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2020.00213.

74. Hanagata, Nobutaka, Toshifumi Takeuchi, Yoshiharu Fukuju, David J. Barnes, и Isao Karube. «Tolerance of Microalgae to High CO2 and High Temperature». Phytochemistry, The International Journal of Plant Biochemistry, 31, вып. 10 (1 октябрь 1992 г.): 3345–48. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83682-O.

75. Generowicz, Agnieszka, Zygmunt Kowalski, и Joanna Kulczycka. «Planning of Waste Management Systems in Urban Area Using Multi-Criteria Analysis». Journal of Environmental Protection 2, вып. 6 (10 август 2011 г.): 736–43. https://doi.org/10.4236/jep.2011.26085.

76. Kamennaya, Nina A., Caroline M. Ajo-Franklin, Trent Northen, и Christer Jansson. «Cyanobacteria as Biocatalysts for Carbonate Mineralization». Minerals 2, вып. 4 (декабрь 2012 г.): 338–64. https://doi.org/10.3390/min2040338.

77. a, Yimin Chen, и Changan Xu a. «How to Narrow the CO2 Gap from Growth-Optimal to Flue Gas Levels by Using Microalgae for Carbon Capture and Sustainable Biomass Production». Journal of Cleaner Production 280 (20 январь 2021 г.): 124448. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124448.

78. Usserbayeva, 2017) Usserbayeva, A. , Zayadan B., Los, D., Sarsekeyeva, F., Bolatkhan, K ., Baizhigitova, Sadvakasova A. (2017), Autoselection of Cyanobacterium sp IPPAS B-1200 strain - Potential producer of biodiesel. JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, T: 256, P.: S113-S113.

79. Sinetova, 2019) Sinetova, M.A., Sidorov, R.A., Starikov, A.Y., Voronkov, A.S., Medvedeva, A.S., Krivova, Z.V., Pakholkova, M.S., Bachin, D.V., Bedbenov, V.S., Gabrielyan, D.A., Zayadan, B.K., Bolatkhan, K., Los, D.A. Assessment of biotechnological potential of cyanobacteria and microalgae strainsfrom IPPAS culture collection. (2019) Biotekhnologiya, 35 (3), pp. 12-29.

80. Заядан, 2013) Заядан Б.К., Акмуханова Н.Р., Садвакасова А.К. Коллекция микроводорослей и методы их культивирования, - Алматы. - 2013. - 144 с.

81. Appenroth, Klaus-J, K Krech, Áron Keresztes, W Fischer, и Henryk Koloczek. «Effects of Nickel on the Chloroplasts of the Duckweeds Spirodela polyrhiza and Lemna minor and Their Possible Use in Biomonitoring and Phytoremediation». Chemosphere 78 (1 ноябрь 2009 г.): 216–23. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.007.

82. Yordanova, Rusina, и Losanka Popova. «Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants». Acta Physiologiae Plantarum 29 (5 ноябрь 2007 г.): 535–41. https://doi.org/10.1007/s11738-007-0064-z.

83. Engineer, Cawas B., Mimi Hashimoto-Sugimoto, Juntaro Negi, Maria Israelsson-Nordström, Tamar Azoulay-Shemer, Wouter-Jan Rappel, Koh Iba, и Julian I. Schroeder. «CO2 Sensing and CO2 Regulation of Stomatal Conductance: Advances and Open Questions». Trends in Plant Science 21, вып. 1 (январь 2016 г.): 16–30. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.014.

84. Gupta, Alok Kumar, Aprajita Kumari, Sonal Mishra, Aakanksha Wany, и Kapuganti J. Gupta. «Chapter Eight - The Functional Role of Nitric Oxide in Plant Mitochondrial Metabolism». В Advances in Botanical Research, под редакцией David Wendehenne, 77:145–63. Nitric Oxide and Signaling in Plants. Academic Press, 2016. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.10.007.

85. Wendehenne, David, ред. «Advances in Botanical Research». В Advances in Botanical Research, 77:i. Nitric Oxide and Signaling in Plants. Academic Press, 2016. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(16)30010-6.

86. Kovacs, Izabella, Alexandra Ageeva, Eva-Esther König, и Christian Lindermayr. «Chapter Two - S-Nitrosylation of Nuclear Proteins: New Pathways in Regulation of Gene Expression». В Advances in Botanical Research, под редакцией David Wendehenne, 77:15–39. Nitric Oxide and Signaling in Plants. Academic Press, 2016. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.10.003.

87. Kossalbayev, 2020) Kossalbayev, B.D., Tomo, T., Zayadan, B.K., Sadvakasova, A.K., Bolatkhan, K., Alwasel, S., Allakhverdiev, S.I. Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production. (2020) International Journal of Hydrogen Energy, 45 (4), pp. 2627-2639

88. Сиренко, 1975) Сиренко Л.А., Сакевич А.И. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Монография. - Киев: Науковадумка, - 1975. - 248 с.

89. Folch, 1957) Folch и другие, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J BiolChem. - 1957.-Vol. 226.-P. 497

90. Yunes J.S. Effects of light and CO2 on nitrite liberation by the heterocystous cyanobacterium Anabaena variabilis // J. Plant Physiol. – 1995. – Vol. 147. – P. 313–320.

91. Gonçalves, A.L., Rodrigues, C.M., Pires, J.S., Simões, V., The effect of increasing $CO_2$ concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria // Algal Research. – 2016. – Vol. 14. – P. 127–136.

92. Morais M.G.D., Costa J.A.V. Biofixation of carbon dioxide by Spirulina sp. and Scenedesmus obliquus cultivated in a threestage serial tubular photobioreactor // J. Biotechnol. – 2007. – Vol. 129. – P. 439–445.

93. China Water Risk. «Fundamental Issues: Industrial Wastewater». Просмотрено 15 июль 2022 г. https://www.chinawaterrisk.org/interviews/fundamental-issues-in-industrial-wastewater/.

94. UNUINWEH. «UN: Rising Reuse of Wastewater in Forecast but World Lacks Data on 'Massive Potential Resource'». *UNU-INWEH* (blog), 5 сентябрь 2013 г. https://inweh.unu.edu/un-rising-reuse-of-wastewater-in-forecast-but-world-lacks-data-on-massive-potential-resource/.

95. Oren, 1985) Oren A., Fattom A., Padan E. and Tietz A. Unsaturated Fatty Acid Composition and Biosynthesis in Oscillatorialimneticaand Other Cyanobacteria. //Archives of Microbiology, -1985. –Vol.141. –P. 138-142.

96. J. Sheehan, T. Dunahay, J. Benemann, and P. Roessler A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from algae," // Tech. Rep. NREL/TP. – 1998. – P. 580.

97. J. K. Pittman, A. P. Dean, and O. Osundeko The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources," // Bioresource Technology. – 2011. - Vol. 102(1). - P. 17–25.

98. Olguín E.J. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products // Biorefinery. Biotechnol Adv. – 2012 – Vol.30. – P.1031–1046.

99. Sadvakasova, Asemgul, Bekzhan Kossalbayev, B. Zayadan, Dariga Kirbayeva, Saleh Alwasel, и Suleyman Allakhverdiev. «Potential of cyanobacteria in the conversion of wastewater to biofuels». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37 (1 август 2021 г.). https://doi.org/10.1007/s11274-021-03107-1.

100. Badr, Omnia, Ibrahim Elshawaf, Hoda El-Garhy, Mahmoud Moustafa, и Omar Farid. «Antioxidant activity and phycoremediation ability of four cyanobacterial isolates obtained from a stressed aquatic system». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 134 (1 май 2019 г.). https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.01.018.

101. Tyagi, Sachin, Rahul Singh, и Shree Tiwari. «Anti-enterococcal and anti-oxidative potential of a thermophilic cyanobacterium, Leptolyngbya sp. HNBGU 003». *Saudi Journal of Biological Sciences* 28 (1 апрель 2021 г.). https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.003.

102. Sundaramoorthy, Balaji, Kalaivani Thiagarajan, и Rajasekaran Chandrasekaran. «Biosorption of Zinc and Nickel and Its Effect on Growth of Different Spirulina Strains». *CLEAN - Soil Air Water* 42 (1 апрель 2014 г.). https://doi.org/10.1002/clen.201200340.

103. Finocchio, Elisabetta, Alessandra Lodi, C. Solisio, и Attilio Converti. «Chromium (VI) removal by methylated biomass of Spirulina platensis: The effect of methylation process». *Chemical Engineering Journal* 156 (15 январь 2010 г.): 264–69. https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.015.

104. Vijayakumar, Subramaniyan, Nooruddin Thajuddin, и C. Manoharan. «Role of cyanobacteria in the treatment of dye industry effluent». *Pollution Research* 24 (1 январь 2005 г.): 69–74.

105. Lau, Nyok-Sean, Minami Matsui, и Amirul Al-Ashraf Abdullah. «Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products». *BioMed Research International* 2015 (2015 г.): 754934. https://doi.org/10.1155/2015/754934.

106. Ichor, Tersagh, Phillip Okerentugba, и Gideon Okpokwasili. «Biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbon by a Consortium of Cyanobacteria Isolated from Crude Oil Polluted Brackish Waters of Bodo Creeks in Ogoniland, Rivers State». *Research Journal of Environmental Toxicology* 10 (1 январь 2016 г.): 16–27. https://doi.org/10.3923/rjet.2016.16.27.

107. Sánchez, Olga, Isabel Ferrera, Nuria Vigués, Tirso Oteyza, Joan Grimalt, и Jordi Mas. «Role of cyanobacteria in oil biodegradation by microbial mats». *International Biodeterioration &*

*Biodegradation* 58 (1 октябрь 2006 г.): 186–95. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.004.

108. «US9315832B2 - Cyanobacterium sp. host cell and vector for production of chemical compounds in Cyanobacterial cultures - Google Patents». Просмотрено 15 июль 2022 г. https://patents.google.com/patent/US9315832B2/en.

109. *The Ecology of Cyanobacteria*. Просмотрено 15 июль 2022 г. https://link.springer.com/book/10.1007/0-306-46855-7.

110. Stal, Lucas J. «Cyanobacterial Mats and Stromatolites». В *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*, под редакцией Brian A. Whitton и Malcolm Potts, 61–120. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_4.

111. Okoh, A., S. Ajisebutu, G. Babalola, и M. R. Trejo-Hernandez. «Potential of Burkholderia Cepacia RQ1 in the Biodegradation of Heavy Crude Oil». *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 4, вып. 2 (июнь 2001 г.): 83–87. https://doi.org/10.1007/s101230100018.

112. Zhou, Jie, и Yin Li. «Engineering Cyanobacteria for Fuels and Chemicals Production». *Protein & Cell* 1, вып. 3 (март 2010 г.): 207–10. https://doi.org/10.1007/s13238-010-0043-9.

113. Kadiyala, Venkateswarlu. «Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential». *Biotechnology Advances*, 1 январь 2011 г. https://www.academia.edu/7450923/Consortia_of_cyanobacteria_microalgae_and_bacteria_Biotechnological_potential.

114. Bolatkhan, Kenzhegul, Assem K. Sadvakasova, Bolatkhan K. Zayadan, Ardak B. Kakimova, Fariza K. Sarsekeyeva, Bekzhan D. Kossalbayev, Ayshat M. Bozieva, Saleh Alwasel, и Suleyman I. Allakhverdiev. «Prospects for the Creation of a Waste-Free Technology for Wastewater Treatment and Utilization of Carbon Dioxide Based on Cyanobacteria for Biodiesel Production». *Journal of Biotechnology* 324 (20 декабрь 2020 г.): 162–70. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.010.

115. Arora, Kanika, Parneet Kaur, Pradeep Kumar, Archana Singh, Sanjay Kumar Singh Patel, Xiangkai Li, Yung-Hun Yang, Shashi Kant Bhatia, и Saurabh Kulshrestha. «Valorization of Wastewater Resources Into Biofuel and Value-Added Products

Using Microalgal System». *Frontiers in Energy Research* 9 (2021 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2021.646571.

116. Piraux, M., L. Silveira, P. Diniz, и G. Duque. «Agroecological transition as a socio-territorial innovation: the case of the territory of Borborema in Brazilian semi-arid.» *Proceedings of a symposium on Innovation and Sustainable Development in Agriculture and Food, Montpellier, France, 28 June to 1st July 2010*, 2010 г. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113168844.

117. Marques, F. Charao, F. Kessler Dal Soglio, и J. D. van der Ploeg. «Constructing Sociotechnical Transitions Toward Sustainable Agriculture», 2010. https://research.wur.nl/en/publications/constructing-sociotechnical-transitions-toward-sustainable-agricu.

118. Zhao, Longfei, Binlin Dou, Hua Zhang, и Zilong Wang. «Oxygen Carriers for Chemical-Looping Water Splitting to Hydrogen Production: A Critical Review». *Carbon Capture Science & Technology* 1 (1 декабрь 2021 г.): 100006. https://doi.org/10.1016/j.ccst.2021.100006.

119. Xu, Yongqing, Cheng Shen, Bowen Lu, Cong Luo, Fan Wu, Xiaoshan Li, и Liqi Zhang. «Study on the Effect of NaBr Modification on CaO-Based Sorbent for CO2 Capture and SO2 Capture». *Carbon Capture Science & Technology* 1 (1 декабрь 2021 г.): 100015. https://doi.org/10.1016/j.ccst.2021.100015.

120. Onyeaka, Helen, Taghi Miri, KeChrist Obileke, Abarasi Hart, Christian Anumudu, и Zainab T. Al-Sharify. «Minimizing Carbon Footprint via Microalgae as a Biological Capture». *Carbon Capture Science & Technology* 1 (1 декабрь 2021 г.): 100007. https://doi.org/10.1016/j.ccst.2021.100007.

121. State of the Planet. «Can Removing Carbon From the Atmosphere Save Us From Climate Catastrophe?», 27 ноябрь 2018 г. https://news.climate.columbia.edu/2018/11/27/carbon-dioxide-removal-climate-change/.

122. Touliabah, Hussein El-Sayed, Mostafa M. El-Sheekh, Mona M. Ismail, и Hala El-Kassas. «A Review of Microalgae- and Cyanobacteria-Based Biodegradation of Organic Pollutants». *Molecules* 27, вып. 3 (январь 2022 г.): 1141. https://doi.org/10.3390/molecules27031141.

123. Singh, Jay Shankar, Arun Kumar, и Mani Singh. «Cyanobacteria: A Sustainable and Commercial Bio-Resource in Production of Bio-Fertilizer and Bio-Fuel from Waste Waters». *Environmental and Sustainability Indicators* 3–4 (1 ноябрь 2019 г.): 100008. https://doi.org/10.1016/j.indic.2019.100008.

124. Sen, Suraj, и Santosh Karn. «Cyanobacteria: The Eco-friendly Tool for the Treatment of Industrial Wastewater», 163–83, 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7904-8_8.

125. Alishah Aratboni, Hossein, Nahid Rafiei, Raúl García-Granados, Abbas Alemzadeh, и Jose Morones-Ramirez. «Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications». *Microbial Cell Factories* 18 (21 октябрь 2019 г.). https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4.

126. Wacker, Alexander, Maike Piepho, John L. Harwood, Irina A. Guschina, и Michael T. Arts. «Light-Induced Changes in Fatty Acid Profiles of Specific Lipid Classes in Several Freshwater Phytoplankton Species». *Frontiers in Plant Science* 7 (2016 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00264.

127. Janda, J. Michael, и Sharon L. Abbott. «16S RRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls». *Journal of Clinical Microbiology* 45, вып. 9 (сентябрь 2007 г.): 2761–64. https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07.

128. Bruno, L., F. Di Pippo, S. Antonaroli, A. Gismondi, C. Valentini, и P. Albertano. «Characterization of Biofilm-Forming Cyanobacteria for Biomass and Lipid Production». *Journal of Applied Microbiology* 113, вып. 5 (2012 г.): 1052–64. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05416.x.

129. Shiels, Katie, Alexandros Tsoupras, Ronan Lordan, Ioannis Zabetakis, Patrick Murray, и Sushanta Kumar Saha. «Anti-Inflammatory and Antithrombotic Properties of Polar Lipid Extracts, Rich in Unsaturated Fatty Acids, from the Irish Marine Cyanobacterium Spirulina Subsalsa». *Journal of Functional Foods* 94 (1 июль 2022 г.): 105124. https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105124.

130. Maslova, I.P., E.A. Mouradyan, S.S. Lapina, G.L. Klyachko-Gurvich, и Dmitry Los. «Lipid Fatty Acid Composition and Thermophilicity of Cyanobacteria». *Russian Journal of Plant*

*Physiology* 51 (1 май 2004 г.): 353–60. https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000028681.40671.8d.

131. Tacke, Thomas, Stefan Wieland, Peter Panster, Martin Bankmann, Reinhold Brand, и Hendrik Magerlein. Hardening of unsaturated fats, fatty acids or fatty acid esters. United States US5734070A, filed 14 август 1996 г., и issued 31 март 1998 г. https://patents.google.com/patent/US5734070A/en.

132. Hoang, Anh Tuan, и Minh Tuan Pham. «Influences of Heating Temperatures on Physical Properties, Spray Characteristics of Bio-Oils and Fuel Supply System of a Conventional Diesel Engine». *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* 8, вып. 5 (2018 г.): 2231–40.

133. Knothe, Gerhard. «Production and Properties of Biodiesel from Algal Oils». В *Algae for Biofuels and Energy*, 207–21, 2013. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_12.

134. Maria A. Sinetova, Kenzhegul Bolatkhan, Roman A. Sidorov, Kirill S. Mironov, Alexandra N. Skrypnik, Elena V. Kupriyanova, Bolatkhan K Zayadan, Maria Shumskaya and Dmitry A. Los (2017) Polyphasic characterization of the thermotolerant cyanobacterium Desertifilum sp. Strain IPPAS B-1220 // FEMS Microbiology Letters, 27 January 2017 pp. 1-10

135. Chittora, Deepali, Mukesh Meena, Tansukh Barupal, Prashant Swapnil, и Kanika Sharma. «Cyanobacteria as a Source of Biofertilizers for Sustainable Agriculture». *Biochemistry and Biophysics Reports* 22 (1 июль 2020 г.): 100737. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100737.

136. Bolatkhan, K., Kossalbayev, B.D., Zayadan, B.K., Tomo, T., Veziroglu, T.N., Allakhverdiev, S.I. Hydrogen production from phototrophic microorganisms: Reality and perspectives. (2019) International Journal of Hydrogen Energy, 44 (12), pp. 5799-5811.

137. Valev, Dimitar, Juha Kurkela, Esa Tyystjärvi, и Taina Tyystjärvi. «Testing the Potential of Regulatory Sigma Factor Mutants for Wastewater Purification or Bioreactor Run in High Light». *Current Microbiology* 77 (1 август 2020 г.). https://doi.org/10.1007/s00284-020-01973-w.

138. Soydemir, Gulfem, ulker diler keris sen, Unal Sen, и Mirat Gurol. «Biodiesel production potential of mixed microalgal culture grown in domestic wastewater». *Bioprocess and biosystems*

*engineering* 39 (1 январь 2016 г.). https://doi.org/10.1007/s00449-015-1487-3.

139. Blazina, Maria, Ines Haberle, Enis Hrustić, Andrea Budiša, Ines Sviličić Petrić, Lucija Konjević, Tina Silovic, Tamara Djakovac, и Suncana Gecek. «Growth Aspects and Biochemical Composition of Synechococcus sp. MK568070 Cultured in Oil Refinery Wastewater» 7 (28 май 2019 г.): 164. https://doi.org/10.3390/jmse7060164.

140. Kamilya, Dibyendu, Sudipto Sarkar, Tapas Maiti, Sukumar Bandyopadhyay, и Bimal Mal. «Growth and nutrient removal rates of Spirulina platensis and Nostoc muscorum in fish culture effluent: A laboratory-scale study». *Aquaculture Research* 37 (17 октябрь 2006 г.): 1594–97. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01588.x.

141. S. Mostafa, Soha, Adel S. El-Hassanin, Amira Sh. Soliman, Sayed Rashad, и Ghadir A. El-Chaghaby. «Microalgae growth in effluents from olive oil industry for biomass production and decreasing phenolics content of wastewater». *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 23, вып. 1 (1 март 2019 г.): 359–65. https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.28265.

142. Mostafa, Soha, Adel El-Hassanin, Sayed Rashad, и Ghadir El-Chaghaby. «Microalgae growth in effluents from olive oil industry for biomass production and decreasing phenolics content of wastewater». *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 23 (1 март 2019 г.): 359–65. https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.28265.

143. El-Sheekh, Mostafa M, Wagieh A El-Shouny, Mohamed E H Osman, и Eman W E El-Gammal. «Growth and Heavy Metals Removal Efficiency of Nostoc Muscorum and Anabaena Subcylindrica in Sewage and Industrial Wastewater Effluents». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, вып. 2 (1 февраль 2005 г.): 357–65. https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.09.005.

144. Magalhães, Iara Barbosa, Jéssica Ferreira, Jackeline de Siqueira Castro, Letícia Rodrigues de Assis, и Maria Lúcia Calijuri. «Technologies for Improving Microalgae Biomass Production Coupled to Effluent Treatment: A Life Cycle Approach». *Algal Research* 57 (1 июль 2021 г.): 102346. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102346.

145. Miyawaki, B., André Mariano, J.V.C. Vargas, Wellington Balmant, A.C. Defrancheschi, Diego Correa, Beatriz Santos, Nelson Selesu, J. Ordonez, и Vanessa Kava. «Microalgae derived biomass and bioenergy production enhancement through biogas purification and wastewater treatment». *Renewable Energy* 163 (1 январь 2021 г.): 1153–65. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.09.045.

146. Muylaert, Koenraad, Annelies Beuckels, Orily Depraetere, Imogen Foubert, Giorgos Markou, и Dries Vandamme. «Wastewater as a Source of Nutrients for Microalgae Biomass Production», 75–94, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16640-7_5.

147. Sharma, Naveen, и Lucas Stal. «The economics of cyanobacteria-based biofuel production: Challenges and opportunities». В *Cyanobacteria: An Economic Perspective*, 167–80, 2014. https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch10.

148. Carvalho, Carla C. C. R. de. «Marine Biofilms: A Successful Microbial Strategy With Economic Implications». *Frontiers in Marine Science* 5 (2018 г.). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2018.00126.

149. Olguin, Eugenia. «Dual Purpose Microalgae-Bacteria-Based Systems That Treat Wastewater and Produce Biodiesel and Chemical Poducts Within a Biorefinery». *Biotechnology advances* 30 (15 май 2012 г.): 1031–46. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001.

150. Claudia, Sepulveda, Gabriel Acien, Carmen Gómez, N. Jiménez-Ruíz, Carlos Riquelme, и Emilio Molina-Grima. «Utilization of centrate for the production of the marine microalgae Nannochloropsis gaditana». *Algal Research* 9 (31 май 2015 г.). https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.004.

151. Giraldo-Calderón, Néstor David, Raquel Juliana Romo-Buchelly, Andrés Alonso Arbeláez-Pérez, Danilo Echeverri-Hincapié, и Lucia Atehortúa-Garcés. «Microalgae Biorefineries: Applications and Emerging Technologies». *DYNA* 85, вып. 205 (2018 г.): 219–33.

152. Ferrini, Thomas, Olivier Grandjouan, Olivier Pourret, и Raul E Martinez. «Does carbon dioxide storage by cyanobacteria induce biomineralization in presence of basaltic glass?» *Geochemical Journal -Japan-* 55, вып. 2 (2021 г.): 51–58. https://doi.org/10.2343/geochemj.2.0617.

153. Romanis, Caitlin S., Leanne A. Pearson, и Brett A. Neilan. «Cyanobacterial Blooms in Wastewater Treatment Facilities: Significance and Emerging Monitoring Strategies». *Journal of Microbiological Methods* 180 (январь 2021 г.): 106123. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106123.

154. Hena, Sufia, N. Abida, и Salma Tabassum. «Screening of facultative strains of high lipid producing microalgae for treating surfactant mediated municipal wastewater». *RSC Adv.* 5 (18 ноябрь 2015 г.): 98805–13. https://doi.org/10.1039/C5RA20019A.

155. Yaakob, Maizatul Azrina, Radin Maya Saphira Radin Mohamed, Adel Al-Gheethi, и Amir MK. «An overview of the utilisation of microalgae biomass derived from nutrient recycling of wet market wastewater and slaughterhouse wastewater». *International Aquatic Research* 9 (24 май 2017 г.). https://doi.org/10.1007/s40071-017-0168-z.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1**

# СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ИНСТРУКЦИИ ПО ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЮ

***Spirulina* medium**

Для выращивания спирулины.

Приготовьте растворы I и II. Автоклавировать отдельно и охладить; асептически соедините два раствора. Асептически добавьте 1 мл раствора цианокобаламина ($B_{12}$).

| **Компоненты** | **Основные компоненты (г/л д$H_2O$)** | **Используемое количество (1 л)** |
|---|---|---|
| **Раствор I (500 мл)** | | |
| $NaHCO_3$ | - | 13,61 гр |
| $Na_2CO_3$ | - | 4,03 гр |
| $K_2HPO_4$ | - | 0,50 гр |
| **Раствор II (500 мл)** | | |
| $NaNO_3$ | - | 2,5 гр |
| $K_2SO_4$ | - | 1,0 гр |
| NaCl | - | 1,0 гр |
| $MgSO_4.7H_2O$ | - | 0,2 гр |
| $CaCl_2.2H_2O$ | - | 0,04 гр |
| $FeSO_4.7H_2O$ | - | 0,01 гр |
| $Na_2EDTA*2H_2O$ | - | 0,08 гр |
| Trace metals solution | смотрите следующий рецепт | 5 мл |

**Микроэлементы**

| **Компоненты** | **Дополнительные компоненты (г/л д$H_2O$)** | **Используемое количество (1 л)** |
|---|---|---|
| $Na_2EDTA.2H_2O$ | - | 0,5 гр |
| $FeSO_4.7H_2O$ | - | 0,7 гр |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 1,0 | 1 мл |
| $MnSO_4.7H_2O$ | 2,0 | 1 мл |
| $H_3BO_3$ | 10,0 | 1 мл |

| | | |
|---|---|---|
| $Co(NO_3)_2.6H_2O$ | 1,0 | 1 мл |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 1,0 | 1 мл |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0,005 | 1 мл |

**Витаминный раствор**

Растворите цианокобаламин в 1 литре дН2О. Профильтровать-стерилизовать и хранить в замороженном виде.

| **Компонент** | **Используемое количество (1 л)** |
|---|---|
| Цианокобаламин (витамин $B_{12}$) | 5 мг |

**Литература**:

AIBA, S., and OGAWA, T. 1977. Assessment of growth yield of a blue-green alga:*Spirulina platensis* in axenic and continuous cultur. *J. Gen. Microbiol.* 102: 179 - 182.

ANDERSEN, R.A. [ed.] 2005. *Algal culturing techniques.* Elsevier, Amsterdam, 578 pp.

**Среда BBM 3N**

**https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/media/BBM.html**

**Состав:**

| **Реактив:** | **Масса, г/л** |
|---|---|
| $NaNO_3$ | 0,75 |
| $KH_2PO_4$ | 0,175 |
| $K_2HPO_4$ (×$3H_2O$) | 0,075 (0,098) |
| $MgSO_4$×$7H_2O$ | 0,075 |
| $CaCl_2$×$2H_2O$ | 0,025 |
| NaCl | 0,025 |
| $FeSO_4$* | 0,005 |
| ЕДТА* | 0,05 |
| Раствор микроэлементов | 1,0 мл |
| агар-агар | 17,0 |
| вода дистилированная | 1 литр |

*можно использовать раствор Fe+ЭДТА в концентрации 1мл/л

**Пропись для раствора микроэлементов (в г/л):**

| | |
|---|---|
| $H_3BO_3$ | 2,86 |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 1,81 |
| $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,222 |
| $MoO_3$ | 0,018 |
| $NH_4VO_3$ | 0,023 |

**Источники:**

*Андреева В.М.б Стрелкова Л.А.* Коллекция культур водорослей в лаборатории альгологии Ботанического института им. Комарова АН СССР // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. Л., 1983, с. 92-104

**Среда Прата**

**Состав:**

| **Реактив** | **Масса, г/л** |
|---|---|
| $KNO_3$ | 0,1 |
| $K_2HPO_4(\times 3H_2O)$ | 0,01 (0,013) |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,01 |
| $FeCl_3 \times 6H_2O$ | 0,001 |
| агар-агар | 12-15 |
| вода дистилированная | 1 литр |

**Источники:**

*Prát S.* Algarum, Hepaticarum, Muscurumque in culturis collectio. Praha, Preslia, 1948. XXII-XXIII. P. 1 – 12.

**Среда Заррука**

https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/media/zarruka.html

**Состав:**

| **Раствор** | **Масса, г/л** |
|---|---|
| $NaHCO_3$ | 16,8 |
| $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ | 1,0 |
| $NaNO_3$ | 2,5 |
| $K_2SO_4$ | 1,0 |
| NaCl | 1,0 |

| | |
|---|---|
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,2 |
| $CaCl_2 \times 2H_2O$ | 0,04 |
| Fe+EDTA | 1,0 мл |
| раствор микроэлементов 1 | 1,0 мл |
| раствор микроэлементов 2 | 1,0 мл |
| агар-агар | 12,0 |
| вода дистиллированная | до 1 литра |

**Рекомендации по приготовлению среды:**

| | **На 1 л среды** |
|---|---|
| Раствор 1 | 200 мл |
| Раствор 2 | 800 мл |
| Fe+EDTA | 1 мл |
| Раствор микроэлементов 1 | 1 мл |
| Раствор микроэлементов 2 | 1 мл |

**Раствор 1**

| | **На 200 мл** |
|---|---|
| $NaHCO_3$ | 16, 8 г |
| $K_2HPO_4 x 3H_2O$ | 1 г |

**Раствор 2**

| | **На 800 мл** |
|---|---|
| $NaNO_3$ | 2,5 г |
| $K_2SO_4$ | 1 г |
| NaCl | 1 г |
| $MgSO_4 x 7H_2O$ | 0,2 г |
| $CaCl_2 x 2H_2O$ | 0,04 г |

**Раствор микроэлементов 1**, г/л:

| | |
|---|---|
| $H_3BO_3$ | 2,86 |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 1,81 |
| $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,22 |
| $CuSO_4 \times 5H_2O$ | 0,08 |
| $MoO_3$ | 0,015 |

**Раствор микроэлементов 2**, г/л**:**

| | |
|---|---|
| $NH_4VO_3$ | 0,023 |
| $K_2Cr_2 (SO_4)_4 \times 24H_2O$ | 0,096 |
| $NiSO_4 \times 7H_2O$ | 0,048 |
| $Na_2WO_4 \times 2H_2O$ | 0,018 |
| $Ti_2(SO_4)_3$ | 0,040 |
| $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$ | 0,044 |

**Источники:**

*Пиневич Г.Д., Верзилин Н.Н., Михайлов А.А.* Изучение *Spirulina platensis* – нового объекта высокоинтенсивного культивирования // Физиология растений. 1970. Т.17. Вып. 5. С. 1037 – 1046.

**Среда S**

https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/media/S.html

**Состав:**

| **Раствор** | **Масса, г/л** |
|---|---|
| KCl | 1 |
| $NaHCO_3$ | 16,8 |
| $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ | 1,3 |
| $NaNO_3$ | 2,5 |
| $K_2SO_4$ | 1,0 |
| NaCl | 30 |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,2 |
| $CaCl_2 \times 2H_2O$ | 0,053 |
| Fe+EDTA | 1,0 мл |
| раствор микроэлементов 1 | 1,0 мл |
| раствор микроэлементов 2 | 1,0 мл |

| | **На 1 л среды** |
|---|---|
| Раствор 1 | 200 мл |
| Раствор 2 | 800 мл |
| Fe+EDTA | 1 мл |
| Раствор микроэлементов 1 | 1 мл |
| Раствор микроэлементов 2 | 1 мл |

**Раствор 1**

| | **На 200 мл** |
|---|---|
| $NaHCO_3$ | 16, 8 г |
| $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ | 1,3 г |

**Раствор 2**

| | **На 800 мл** |
|---|---|
| $NaNO_3$ | 2,5 г |
| $K_2SO_4$ | 1 г |
| NaCl | 30 г |
| KCl | 1 г |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,2 г |
| $CaCl_2 \times 2H_2O$ | 0,053 г |

**Прописи для растворов микроэлементов в граммах на литр:**
**Раствор микроэлементов 1**:

| | |
|---|---|
| $H_3BO_3$ | 2,86 |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 1,81 |
| $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,22 |
| $CuSO_4 \times 5H_2O$ | 0,08 |
| $MoO_3$ | 0,015 |

**Раствор микроэлементов 2:**

| | |
|---|---|
| $NH_4VO_3$ | 0,023 |
| $K_2Cr_2 (SO_4)_4 \times 24H_2O$ | 0,096 |
| $NiSO_4 \times 7H_2O$ | 0,048 |
| $Na_2WO_4 \times 2H_2O$ | 0,018 |
| $Ti_2(SO_4)_3$ | 0,040 |
| $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$ | 0,044 |

**Среда Аллен** с глюкозой, модификация Сенцовой

https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/media/Allen+glu.html

**Раствор солей в граммах на 500 мл:**

| **Реактив:** | **Масса, г/л** |
|---|---|
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1,32 |
| $KH_2PO_4$ | 0,27 |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,25 |
| $CaCl_2 \times 2H_2O$ | 0,074 |
| $FeSO_4 \times 7H_2O$* | 0,02 |
| раствор микроэлементов | 1,0 мл |
| вода дистиллированная | 1 литр |
| агар-агар | 20,0 |

* можно использовать раствор Fe+ЭДТА в концентрации 1мл/л
pH доводится до 2-3 $H_2SO$

**Раствор глюкозы в граммах на 500 мл:**

| **Реактив:** | **Масса, г/л** |
|---|---|
| глюкоза | 1,0 |
| агар-агар | 20 |

**Пропись для раствора микроэлементов (в г/л):**

| | |
|---|---|
| $H_3BO_3$ | 2,86 |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 1,81 |
| $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,222 |
| $MoO_3$ | 0,018 |
| $NH_4VO_3$ | 0,023 |

Дистиллированная вода до 1 л.

**Источники:**

*Allen M.B.* Studies with Cyanidium caldarium, an annormaly pigmented Chlorophyta // Arch.Microbiol. 1959. v.32. p.270

**Среда №6 (Громова) и её вариации №6-N (без азота), 1/3 №6 (полужидкая)**

https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/media/N6_and%20variations.html

**Состав, г/л:**

| **Реактив** | **№6** | **№6-N** | **1/3 №6*** |
|---|---|---|---|
| $KNO_3$ | 1,0 | - | 1,0 |
| $K_2HPO_4$ ($\times 3H_2O$) | 0,2 (0,262) | 0,2 (0,262) | 0,2 (0,262) |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| $CaCl_2$($\times 2H_2O$) | 0,15 (0,198) | 0,15 (0,198) | 0,15 (0,198) |
| $NaHCO_3$ | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Fe+ЭДТА | 1 | 1 | 1 |
| раствор микроэлементов 1 (мл) | 1 | 1 | 1 |
| раствор микроэлементов 2 (мл) | 1 | 1 | 1 |
| агар-агар | 12 | 12 | 4 |
| вода дистиллированная | до 1 л | до 1 л | до 1 л |

**Прописи для растворов микроэлементов в граммах на литр:**

**Раствор микроэлементов 1**:

| | |
|---|---|
| $H_3BO_3$ | 2,86 |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 1,81 |
| $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,22 |
| $CuSO_4 \times 5H_2O$ | 0,08 |
| $MoO_3$ | 0,015 |

**Раствор микроэлементов 2:**

| | |
|---|---|
| $NH_4VO_3$ | 0,023 |
| $K_2Cr_2 (SO_4)_4 \times 24H_2O$ | 0,096 |
| $NiSO_4 \times 7H_2O$ | 0,048 |
| $Na_2WO_4 \times 2H_2O$ | 0,018 |
| $Ti_2(SO_4)_3$ | 0,040 |
| $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$ | 0,044 |

**Среда для *Chlorella protothecoides***

https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/media/Prothecoides.html

**Состав:**

| **Реактив** | **Масса, г/л** |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 0,7 |
| $K_2HPO_4(\times 3H_2O)$ | 0,3 (0,392) |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,3 |
| мочевина | 1 |
| $FeSO_4 \times 7H_2O$* | 0,003 |
| раствор микоэлементов | 1 мл |
| агар-агар | 20,0 |
| вода дистиллированная | до 1 л |

* можно использовать раствор Fe+ЭДТА в концентрации 1мл/л

После стерилизации добавляется витамин B1 в конечной концентрации 10мг/л (опционально)

**Пропись для раствора микроэлементов (в г/л):**

| | |
|---|---|
| $H_3BO_3$ | 2, 86 |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 1,81 |
| $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,222 |
| $MoO_3$ | 0,018 |
| $NH_4VO_3$ | 0,023 |

**Источники:**

*Shihira-Ishikawa I., Hase E.* Nutritional control of cell pigmentation in *Chlorella protothecoides* with special reference to the degeneration of chloroplasts indused by glucose // Plant and Cell Phisiology. 1964. v. 5. P. 227-240.

**Среда TAP**

https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/media/TAP.html

Среда готовиться из заранее приготовленных растворов по следующей прописи:

| | |
|---|---|
| Раствор Бейерника | 50 мл |
| Раствор B | 0,375 мл |
| Микроэлементы Hunters | 1 мл |
| 2M Tris-AcOH | 10 мл |
| Агар | 15 г |
| Вода дистилированная | до 1000 мл |

**Рекомендации по приготовлению готовых растворов:**

**Раствор Бейерника:**

| | |
|---|---|
| $NH_4Cl$ | 8 г |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 2 г |
| $CaCl_2 \times 2H_2O$ | 1 г |
| Вода дистилированная | до 1000 мл |

**Раствор B:**

| | |
|---|---|
| $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ | 37,73 г |
| $KH_2PO_4$ | 14,4г |
| Вода дистилированная | до 100 мл |

**Раствор микроэлементов Hunters**:

Для 1000 мл конечной смеси растворить каждое вещество в указанном количестве воды. EDTA следует растворять в кипящей воде, а FeSO4 готовить последним, чтобы избежать окисления.

| **Вещество** | **масса** | **вода дистилированная** |
|---|---|---|
| EDTA динатриевая соль | 50 г | 250 мл |
| $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 22 г | 100 мл |
| $H_3BO_3$ | 11,4 г | 200 мл |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 5,06 г | 50 мл |
| $CoCl_2 \times 6H_2O$ | 1,61 г | 50 мл |
| $CuSO_4 \times 5H_2O$ | 1,57 г | 50 мл |
| $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ | 1,1 г | 50 мл |
| $FeSO_4 \times 7H_2O$ | 4,99 г | 50 мл |

**2M Tris-AcOH (pH = 7,0). Порядок приготовления:**

| | |
|---|---|
| TRIS | 242 г |
| Вода дистилированная | до 600 мл |
| AcOH | до pH=7 |
| Вода дист. | до 1000 мл |

**Источники:**

*Gorman, D.S., R.P. Levine* (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1665-1669.

**Среда Тамия, модиф.**

https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/media/2.Tamia.html

**Состав:**

| **Реактив** | **Масса г/л** |
|---|---|
| $KNO_3$ | 5,0 |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 2,5 |
| $KH_2PO_4$ | 1,25 |
| ЭДТА | 0,037 |
| $FeSO_4 \times 7H_2O$* | 0,009 |

| | |
|---|---|
| раствор микроэлементов | 1 мл |
| агар-агар | 20,0 |
| вода дистилированная | 1 литр |

* можно использовать раствор Fe+ЭДТА в концентрации 1мл/л

**Пропись для раствора микроэлементов (в г/л):**

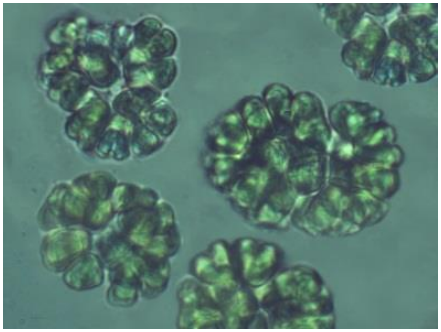
| | |
|---|---|
| $H_3BO_3$ | 2, 86 |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 1,81 |
| $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,222 |
| $MoO_3$ | 0,018 |
| $NH_4VO_3$ | 0,023 |

**Источники:**

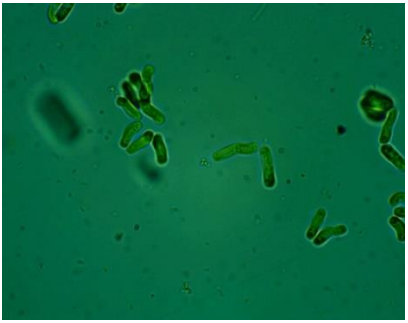
*Кузнецов Е.Д., Владимирова М.Г.* Железо как фактор, лимитирующий рост хлореллы на среде Тамия // Физиология растений. 1964. Т.11. Вып. 4. С. 615 – 619.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2**

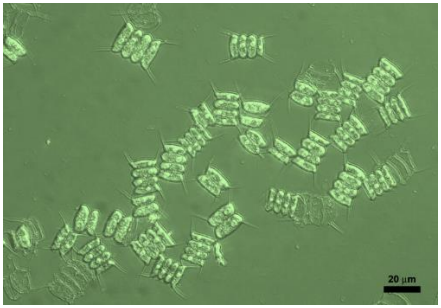
# ФОТОГРАФИИ ВИДОВ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИМЕЮЩИХ ЗНАЧЕНИЕ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ



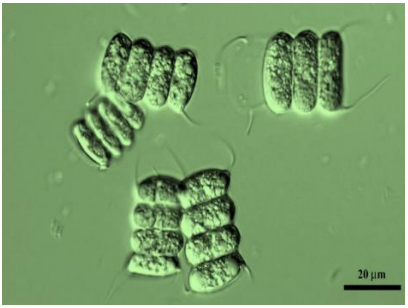
***Ботракоккус***



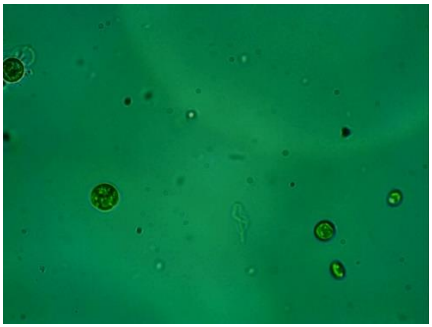
***Klebsormidium* sp.**



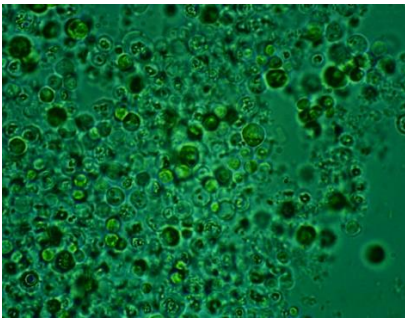

***Desmodesmus communis***
*Источник: ccala.butbn.cas.cz*



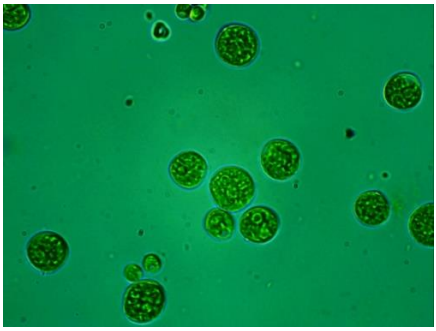

***Desmodesmus* cf. opoliensis**
*Источник: ccala.butbn.cas.cz*



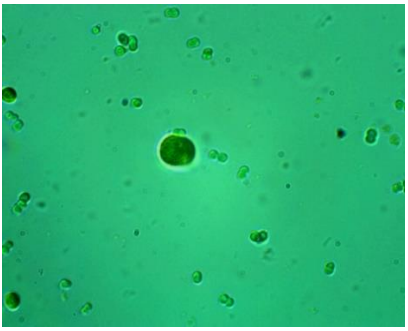
***Chlorella vulgaris***



***Neochloris texensis***



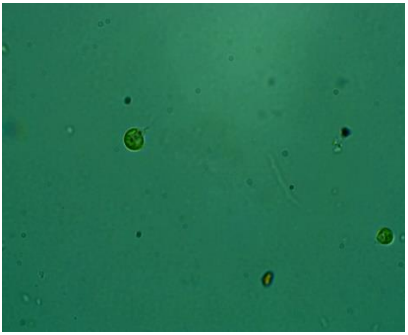
***Actinochloris sphaerica***



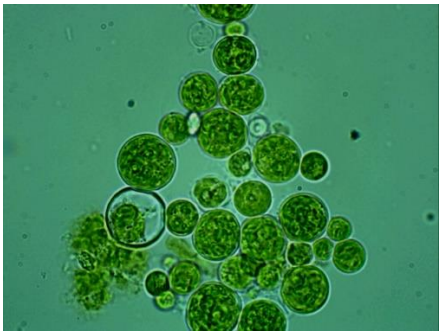
***Aphanocapsa rivularis***



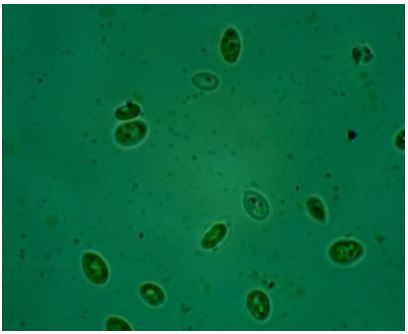
***Anagnostidinema acutissimum***



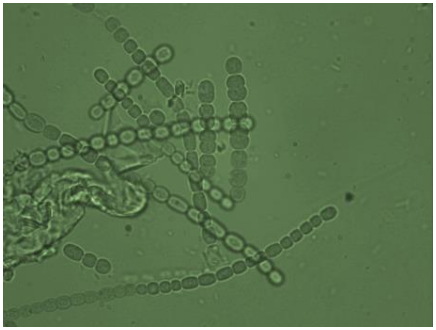
***Chlamydomonas* cf.**



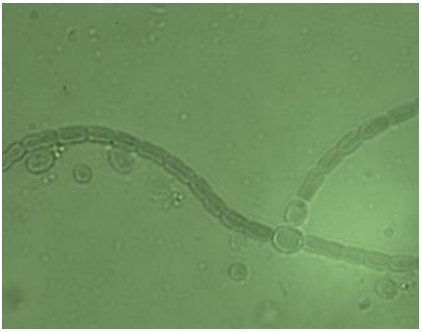
***Bracteacoccus occidentalis***



***Euglena mucifera***



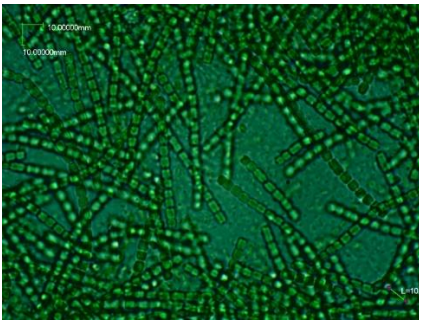
***Anabaena* sp.**



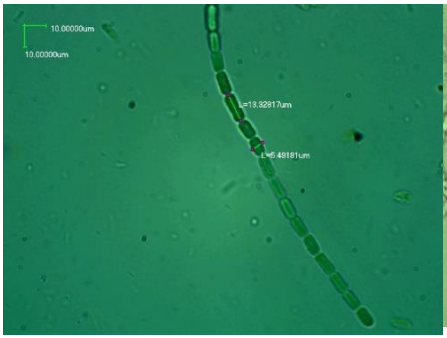
***Anabaena variabilis***



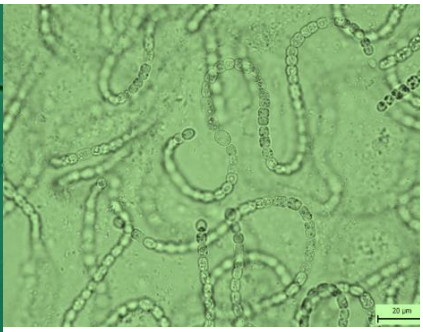
***Anabaena* sp. Z-1**



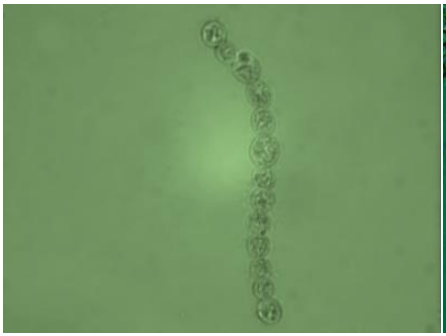
***Anabaena augstumalis***



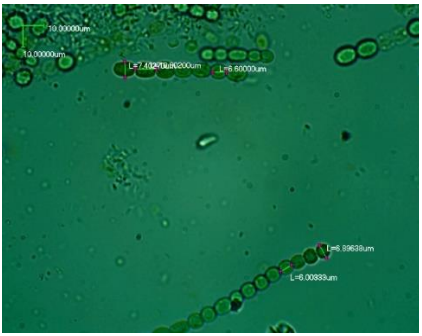

**Anabaena torulosa**



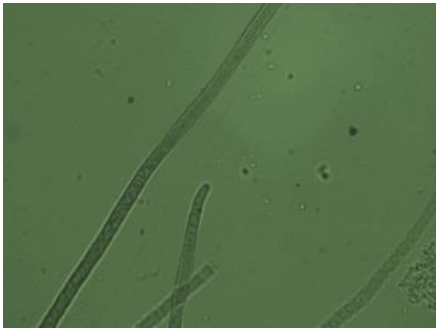

***Trichormus azollae***



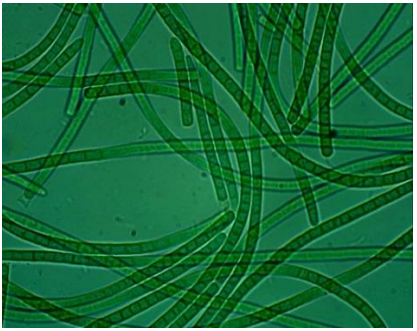
***Nostoc calsicola***



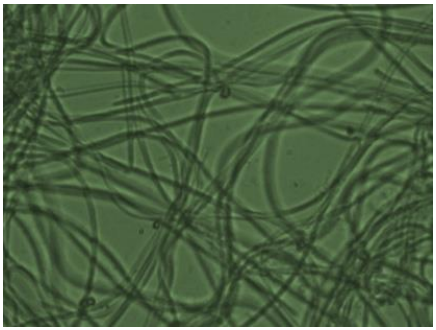

***Nostoc* sp.**



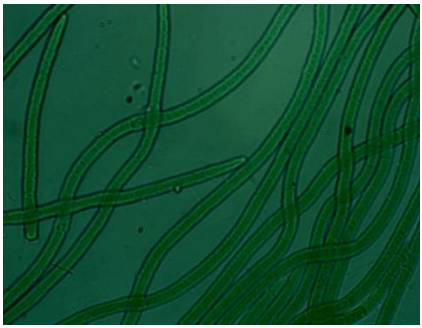
***Oscillatoria* sp.**



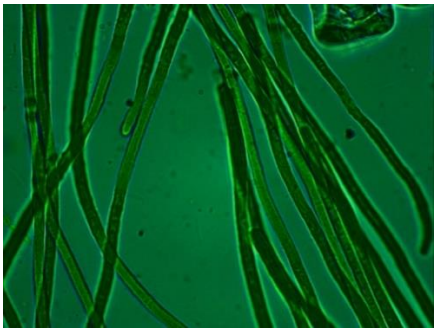
***Phormidium* sp.**



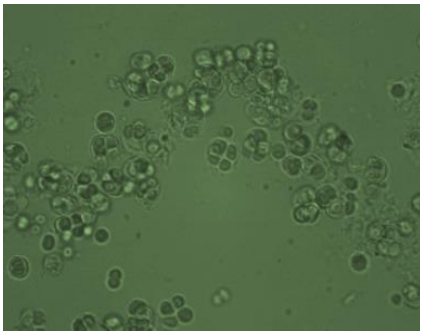
***Phormidium animale***



***Kamptonema animale***



***Microcoleus* sp.**



***Chroococcidiopsis cubana***

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3**

# ФОТОГАЛЕРЕЯ СОТРУДНИКОВ ЛАБОРАТОРИИ БИОТЕХНОЛОГИИ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ



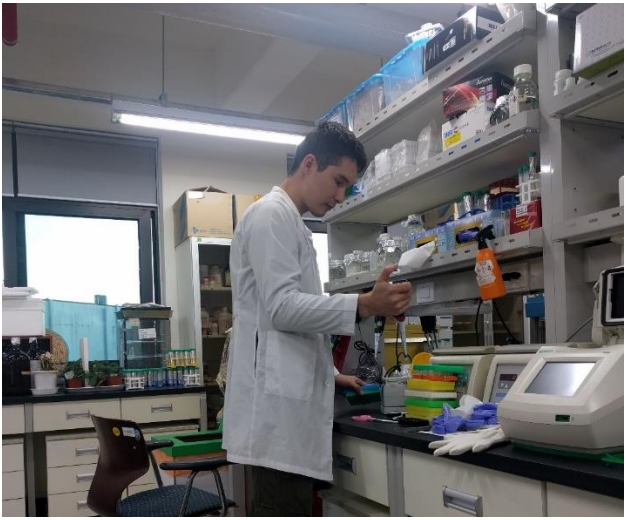

Сотрудники лаборатории фотобиотехнологии во главе с руководителем группы д.б.н., профессором, академиком НАН РК Б.К.Заяданом



Сотрудники лаборатории фотобиотехнологии



PhD доктор Косалбаев Б.Д. с научным руководителем д.б.н., профессором Б.К.Заяданом



PhD доктор Косалбаев Б.Д., за работой по филогенетическому анализу сеянцев яблони в лаборатории биотехнологии



Иностранный студент в процессе экспериментальной работы в лаборатории



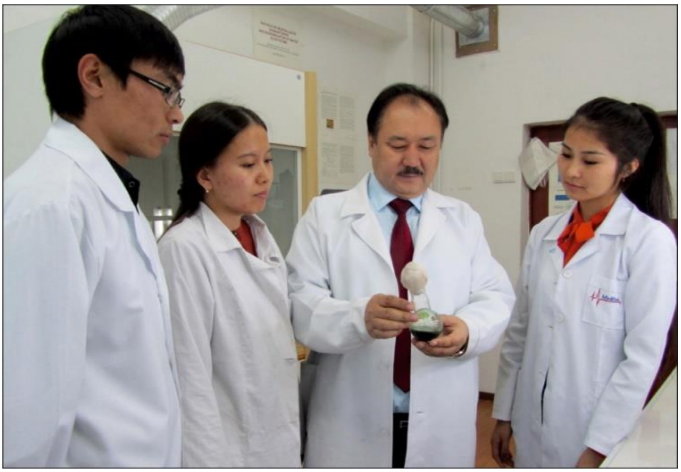
Сотрудники лаборатории фотобиотехнологии: к.б.н., доцент Садвакасова А.К., PhD доктор Усербаева А.А., PhD доктор Бауенова М.О., к.б.н., доцент Акмуханова Н.Р.



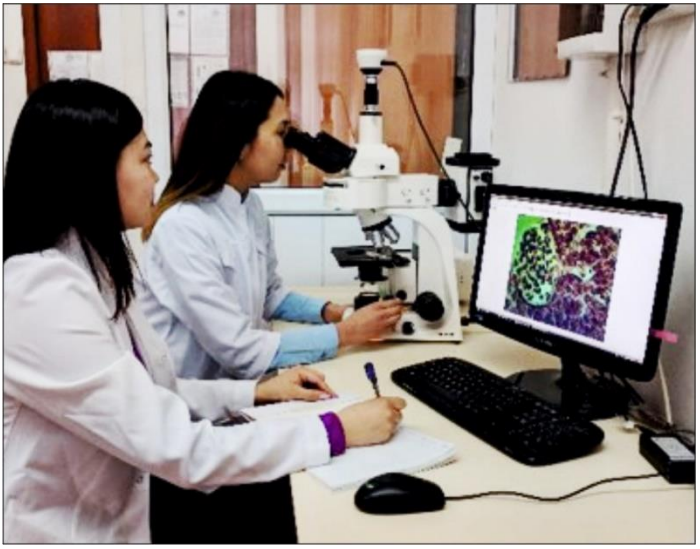

PhD доктор Косалбаев Б.Д., за работой по массовому культивированию штаммов цианобактерий из коллекции фототрофных микроорганизмов КазНУ




Д.б.н., профессор, академик НАН РК Б.К. Заядан со студентами участвовал в проекте ЭКСПО-2017



Доктор, профессор Б.К. Заядан со студентами-магистрантами



PhD доктор Усербаева А.А.  и студент Ахметкалиева Б.
в процессе проведения эксперимента



Международные коллаборатоpы научной группы профессор Татцуя Томо и д.б.н., профессор, член корр.РАН Сулейман Аллахвердиев на научном семинаре



Д.б.н., профессор Заядан Б.К. с докторантом Х.Балуч и ее зарубежным консультантом профессором Зихни Демирбаг в процессе работы



Д.б.н., профессор Б.К. Заядан  и PhD доктор Бауенова М.О. во время визита зарубежного коллаборатора,  профессора Миколай Кокоцинского из Университета Адама Мицкевича (г.Познань, Польша)



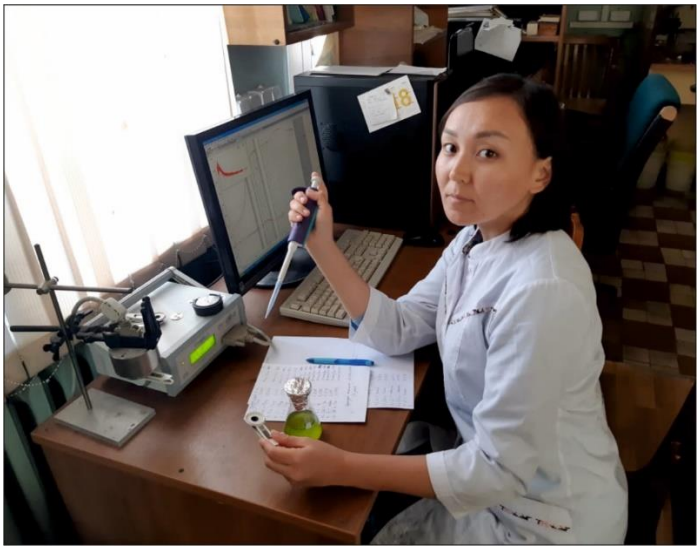

Д.б.н., профессор Б.К. Заядан  на Международной конференции в ИФР имени К.А. Тимирязева РАН, Россия, 2019



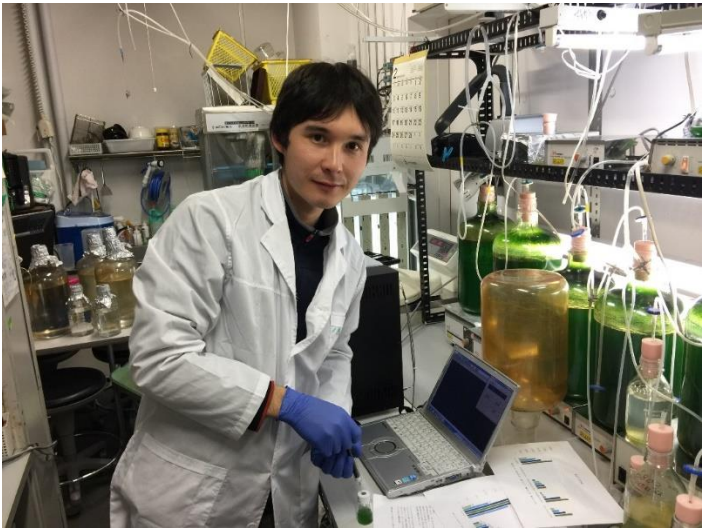

PhD доктор Косалбаев Бекжан во время участия в конференции Japan-Taiwan Plant Biology 2019, Япония



PhD доктор Балуч Хума во время экспедиции, Алматинская область



Докторант Тореханова М., во время стажировки в МГУ имени М.В. Ломоносова, 2019 Россия



PhD доктор Косалбаев Б.Д. на стажировке в Токийском университете науки 2020, Япония




PhD доктор Бауенова М.О. во время стажировки в Университете Адама Мицкевича, 2019, Польша



Мустапаева Ж.О., докторант лаборатории фотобиотехнологии, стажировка в "Институте физиологии растений РАН" (Россия), 2022 г.



Какимова А.Б., докторант лаборатории фотобиотехнологии,
стажировка в центре "Алгатех" (Чехия), 2022 г.

**Косалбаев Б.Д., Садвакасова А.К., Заядан Б.К.**

# ФОТОТРОФНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ

Подписано в печать 01.11.2022 г.
Тираж 500 экз. Формат 60х84х 1/16. Бумага типогр. № 1.
Уч.-изд.л.19,0. Заказ № 304. Цена договорная.

Издание КазНИТУ им. К. И. Сатпаева
Издательство “PolyTech”
г. Алматы, ул. Сатпаева, 22

ISBN 978-601-323-295-9

