

# Mikroorganizmy jako producenci biowodoru: Od badań podstawowych do prac rozwojowych z dziedziny biotechnologii

Microorganisms as producers of biohydrogen: From basic research to R&D in biotechnology

Anna Sikora, Anna Detman<sup>\*)</sup>

**Słowa kluczowe:** biowodór, mikroorganizmy, bakterie, beztlenowy rozkład biomasy, kwasogenez, ciemne fermentacje, fotofermentacja, biofotoliza, szlaki metaboliczne, przemysł cukrowniczy

## Streszczenie

Biowodór powstaje w wyniku aktywności metabolicznej mikroorganizmów w warunkach beztlenowych. W artykule omówiono szlaki metaboliczne produkcji biowodoru: biofotolizę, fotofermentację i ciemne fermentacje. Szczególny nacisk położono na procesy produkcji biowodoru na etapie kwasogenez beztlenowego rozkładu biomasy (ciemna fermentacja i konwersja mleczanu i octanu do maślanu) jako obiecującą metodę produkcji biowodoru. Produkcja biowodoru taką metodą charakteryzuje się niską wydajnością i wymaga ograniczenia procesów konkurencyjnych, głównie innych typów fermentacji kwaśnych. Produkcja biowodoru na etapie kwasogenez jest możliwa w instalacjach dwu- lub wieloetapowych, w których etap kwasogenez jest oddzielony czasowo i przestrzennie od etapów acetogenez i metanogenez. Przedstawiono prace nad tego typu technologią na przykładzie dwuetapowej instalacji produkcji biowodoru i biometanu na drodze beztlenowego rozkładu produktów ubocznych przemysłu cukrowniczego opracowanej w jednostce naukowej i rozwijanej przez partnera przemysłowego. Omówiono wyzwania i ograniczenia produkcji biowodoru, zwłaszcza na etapie kwasogenez. Zdefiniowano powody niedojrzałości technologii produkcji biowodoru i pozostawanie ich ciągle na etapie badawczo-rozwojowym w porównaniu do zaawansowanych, wdrażanych rozwiązań produkcji biogazu.

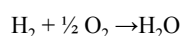
**Keywords:** biohydrogen, microorganisms, bacteria, anaerobic digestion, acidogenesis, dark fermentation, photofermentation, biofotolysis, metabolic pathways, sugar industry

## Abstract

Biohydrogen is produced by the metabolic activity of microorganisms under anaerobic conditions. The article discusses the metabolic pathways of biohydrogen production: biophotolysis, photo-fermentation, and dark fermentations. Special emphasis was put on biohydrogen production processes at the acidogenesis stage of anaerobic digestion (dark fermentation and conversion of lactate and acetate to butyrate) as a promising method of biohydrogen production. The production of biohydrogen by such a method has low yields and requires the reduction of competing processes, mainly other types of acid fermentation. Production of biohydrogen at the acidogenesis stage is possible in two-stage or multi-stage systems, in which the acidogenesis stage is separated in time and space from the acetogenesis and methanogenesis stages. The work on such a technology is presented using the example of a two-stage installation for the production of biohydrogen and biomethane by anaerobic digestion of sugar industry by-products developed at a research unit and being developed by an industrial partner. Challenges and limitations of biohydrogen production were discussed, especially at the acidogenesis stage. Reasons for the immaturity of biohydrogen production technologies and their still remaining in the research and development stage compared to advanced, implemented biogas production solutions were discussed.

## 1. Wodór i sposoby jego otrzymywania

Wodór, pierwiastek chemiczny o najmniejszej masie atomowej, rozpoczynający układ okresowy, uważany jest za jeden z istotniejszych nośników energii w niedalekiej przyszłości. Wodór stanowi czyste i wydajne źródło energii. Jego energia właściwa wynosi 33 Wh/g i jest najwyższa spośród wszystkich paliw. Jedynym produktem spalania wodoru jest woda:



Nie następuje przy tym emisja ditlenku węgla (Abdalla i wsp., 2018; Piela i Zelenay, 2004).

Mimo, że wodór jest najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem w przyrodzie, to w czystej postaci nie występuje a jedynie w związkach chemicznych, głównie w postaci wody i związków organicznych. Stąd konieczne są metody jego pozyskiwania. W zależności od metod i źródeł jego pozyskania, wodór nosi nazwy (<https://seshydrogen.com/en/the-9-colors-of-hydrogen-learn-about-their-meaning-use-and-exploitation-potential/>):

<sup>\*)</sup> Anna Sikora, dr hab., prof. IBB PAN, Anna Detman, dr inż. Pracownia Białej Biotechnologii Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

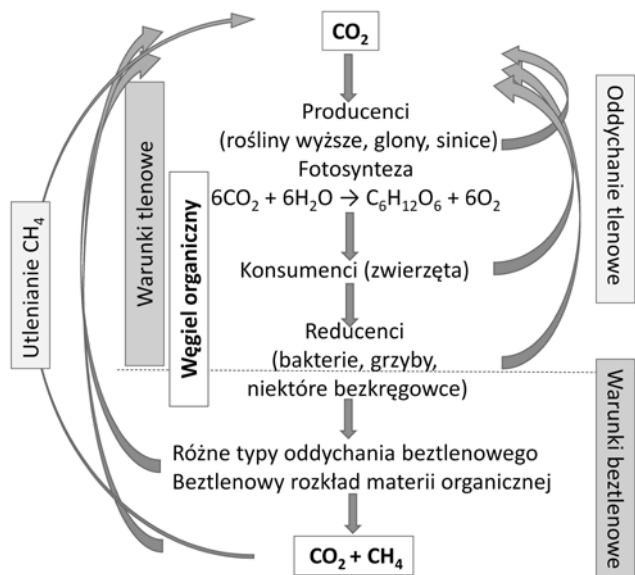
- Wodór „czarny” i „brązowy” – wysokoemisyjny (przy jego produkcji powstają duże ilości ditlenku węgla), wytwarzany w wyniku zgazowania, odpowiednio, węgla kamiennego i brunatnego;
- Wodór „szary” – wysokoemisyjny, otrzymywany w wyniku reformingu gazu ziemnego (metanu);
- Wodór „niebieski” – niskoemisyjny ze źródeł nieodnawialnych, pozyskiwany z reformingu gazu ziemnego (metanu) z technologią wychwytywania, składowania i wykorzystywania ditlenku węgla;
- Wodór „turkusowy” – pozyskiwany w wyniku pirolizy metanu/biometanu przy wykorzystaniu różnych źródeł energii w tym OZE i energii atomowej;
- Wodór „fioletowy/różowy/czerwony” – zeroemisyjny, otrzymywany w wyniku elektrolizy wody z wykorzystaniem energii atomowej;
- Wodór „zielony” – zeroemisyjny, otrzymywany
  - (i) w wyniku elektrolizy wody, z wykorzystaniem energii ze źródeł odnawialnych typu elektrownia wiatrowa, fotowoltaika, w tym ostatnim przypadku coraz częściej pojawia się określenie wodór „żółty” lub
  - (ii) w wyniku termicznego przekształcenia biomasy (gazyfikacja, piroliza);
- Biowodór – będący produktem procesów metabolicznych mikroorganizmów beztlenowych.

Biowodór zaliczany do zielonego wodoru, jednak w najnowszych opracowaniach wydzielony go jako odrębną kategorię (Pituła, 2020). Wynika to z różnic w procesie wytwarzania i kompletnie innych problemów w porównaniu, np. do elektrolizy jako metody otrzymywania zielonego wodoru. Biowodór powstaje w wyniku aktywności metabolicznej mikroorganizmów w warunkach beztlenowych. Często otrzymujemy go w mieszaninie gazów, np. w postaci gazu fermentacyjnego. Powstają też inne niegazowe produkty fermentacji oraz biomasa mikroorganizmów, które wymagają zagospodarowania.

Wszystkie metody otrzymywania wodoru w procesach energochłonnych, opartych na nieodwracalnych źródłach energii lub wykorzystujące paliwa kopalne jako źródło wodoru, emitują duże ilości ditlenku węgla. Produkcja czystego nośnika energii takimi metodami jest bezzasadna.

Aby osiągnąć strategiczny długoterminowy cel ustalony przez Unię Europejską, określony w Europejskim Zielonym Ładzie, tj. neutralność klimatyczną do 2050 r. i odejście od paliw kopalnych, to konsekwentnie musimy je również wyeliminować z metod otrzymywania wodoru. Należy zatem rozwijać technologie pozyskiwania wodoru „turkusowego” z biometanu, „fioletowego/różowego/czerwonego”, „zielonego” i biowodoru.

Należy tu podkreślić, że proces produkcji „zielonego” wodoru lub biowodoru z biomasy również emituje ditlenek węgla. Jednak jest to gaz



Rys 1. Uproszczony schemat obiegu węgla w przyrodzie. Na schemacie pokazano procesy zachodzące w warunkach tlenowych i beztlenowych.

Fig. 1. A simplified scheme of the carbon cycle in nature. The processes occurring under aerobic and anaerobic conditions were shown.

pochodzący z bieżącej produkcji roślinnej, każda biomasa rozkładana jest do ditlenku węgla, który następnie pochłaniany jest w procesach fotosyntezy, zgodnie z podstawowymi zasadami krążenia materii i przepływu energii w przyrodzie, co pokazuje uproszczony schemat krążenia węgla w ekosystemach (rys. 1) (Nicklin i wsp., 2004). Problemem jest nadmiarowy ditlenek węgla pochodzący z paliw kopalnych.

## 2. Mikrobiologiczna produkcja biowodoru

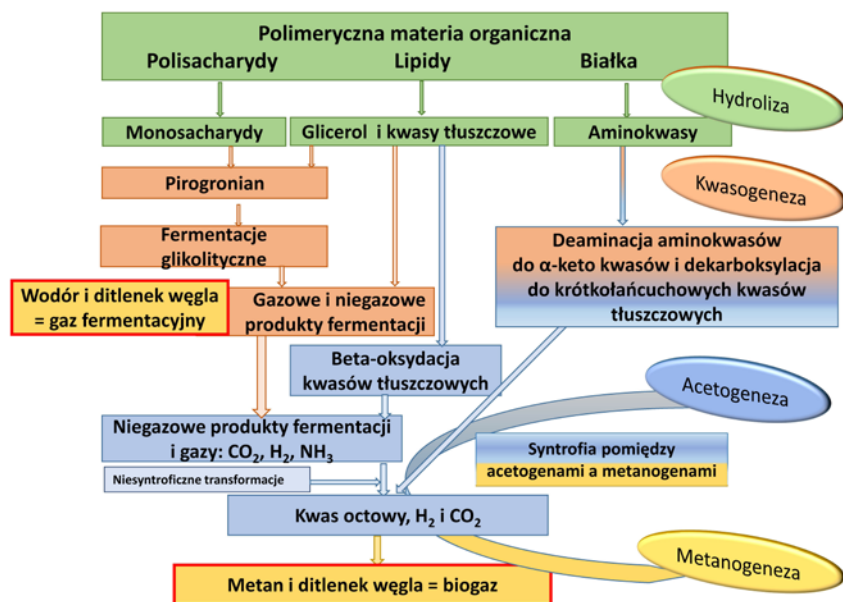
Do podstawowych czynności każdego organizmu żywego, a więc i mikroorganizmów, należą odżywianie i oddychanie, czyli pozyskiwanie energii. Jednocześnie świat mikroorganizmów jest bardzo różnorodny, a za tym idzie bogactwo procesów metabolicznych, które zaspokajają podstawowe potrzeby. Poznając te procesy, odkrywamy te z nich, które są użyteczne dla człowieka i próbujemy wykorzystywać je do naszych celów. Takimi zagadnieniami zajmują się dziedzina nauk biologicznych – biotechnologia. Ogromnym zainteresowaniem cieszą się szlaki metaboliczne, w których produkowany jest biowodór. Są to następujące procesy, zestawione w tabeli I:

Tabela I. Procesy biologiczne, w których produkowany jest wodór

Table I. Biological processes that produce hydrogen

Proces	Mikroorganizmy	Warunki	Ograniczenia
Bezpośrednia biofotoliza (światło, enzymy w komórce) $2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2$	Mikroskopijne glony – zielenice: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Chlorella fusca</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> .	Źródło światła, warunki beztlenowe, niedobór siarki w podłożu	– Powstający tlen hamuje proces; – Utrzymanie specyficznych warunków dla procesu
Pośrednia biofotoliza Proces dwuetapowy: fotosynteza i wiązanie azotu $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP^* \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$	Sinice – mikroorganizmy spokrewnione z bakteriami, rodzaje <i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Calothrix</i>	Źródło światła, warunki beztlenowe, niedobór azotu i siarki w podłożu	– Konieczność zagospodarowania biomasy mikroorganizmów
Fotofermentacja Proces dwuetapowy: fotosynteza w warunkach beztlenowych i wiązanie azotu $4ATP + 2e^- + 2H^+ \rightarrow 4ADP + 4P_i + H_2$	bakterie purpurowe bezsiarkowe, rodzaje <i>Rhodospseudomonas</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodobium</i> – Zapewnienie specyficznych warunków dla procesu	Źródło światła, Warunki beztlenowe, Kwasy organiczne, Niedobór azotu w podłożu	– Zapewnienie specyficznych warunków dla procesu
Ciemne fermentacje – etap kwasogonyzy w czasie beztlenowego rozkładu związków organicznych	<i>Clostridiaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Prevotellaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i>	Proces powszechnie występujący w środowiskach beztlenowych	Warunki selekcyjne ciemne fermentacje

\*ATP, adenozynotrójfosforan (uniwersalny nośnik energii w komórkach organizmów żywych)



Rys. 2. Beztlenowy rozkład biomasy: hydroliza – dekompozycja polimerów do monomerów; kwasogenyza – etap fermentacji kwasnych, w których produkty hydrolizy przekształcane są do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, aldehydów, alkoholi oraz produktów gazowych (powstałe produkty końcowe definiują typ fermentacji); octanogenyza – utlenianie niegazowych produktów fermentacji kwasnych do octanu, wodoru i ditlenku węgla, substratów dla metanogenów; metanogenyza – etap produkcji metanu: z octanu (szlak acetotroficzny); z ditlenku węgla i wodoru (szlak hydrogenotroficzny) oraz w wyniku redukcji grup metylowych (szlak metylotroficzny).

Fig. 2. Anaerobic digestion of biomass: hydrolysis – decomposition of polymers into monomers; acidogenesis – acid fermentations in which the products of hydrolysis are converted to short-chain fatty acids, aldehydes, alcohols, and gaseous products (the end products define the type of fermentation); acetogenesis – the oxidation of non-gaseous products of acid fermentation to acetate, hydrogen and carbon dioxide, substrates for methanogens; methanogenesis – the step of producing methane from acetate (acetotrophic pathway); from carbon dioxide and hydrogen (hydrogenotrophic pathway) and as a result of reduction of methyl groups (methylotrophic pathway).

- Bezpośrednia biofotoliza – fotosyntetyczna produkcja biowodoru w komórkach mikroskopijnych glonów, zielenic. W procesie tym energia świetlna jest wykorzystywana do rozbicia cząsteczki wody na wodór i tlen, przy udziale fotosyntetycznych kompleksów białkowych. Aby nastąpiła indukcja procesów produkcji biowodoru, wymagana jest okresowa inkubacja komórek zielenic w warunkach beztlenowych, w środowisku ubogim w siarkę w, celu zahamowania etapów tworzenia tlenu i absorpcji ditlenku węgla. Zielone algi mają też enzymy innych szlaków metabolicznych, które umożliwiają im produkowanie biowodoru w warunkach beztlenowych z kwasu octowego, dostarczanego w podłożu (Ghirardi i wsp., 2000; Sikora 2008; Fakhimi i wsp., 2020; Li i wsp., 2022).
- Pośrednia biofotoliza – produkcja biowodoru przez sinice, fotosyntetyzujące mikroorganizmy spokrewnione z bakteriami. Szlak powstawania biowodoru jest dość złożony. Najpierw zachodzi fotosynteza podobna do tej zachodzącej w komórkach roślinnych, potem następuje wiązanie azotu cząsteczkowego. Wodór jest wy-

dzielany jako produkt uboczny podczas wiązania azotu, w wyniku aktywności nitrogenazy. Procesowi temu sprzyja niedobór azotu w podłożu, w którym hodowane są sinice. Proces wymaga również czasowych warunków beztlenowych oraz niedoboru siarki w podłożu, co hamuje niekorzystne dla produkcji biowodoru procesy w komórkach (Pinto i wsp., 2002; Sikora, 2008; Li i wsp., 2022).

Ograniczeniami procesów bezpośredniej i pośredniej fotolizy są:

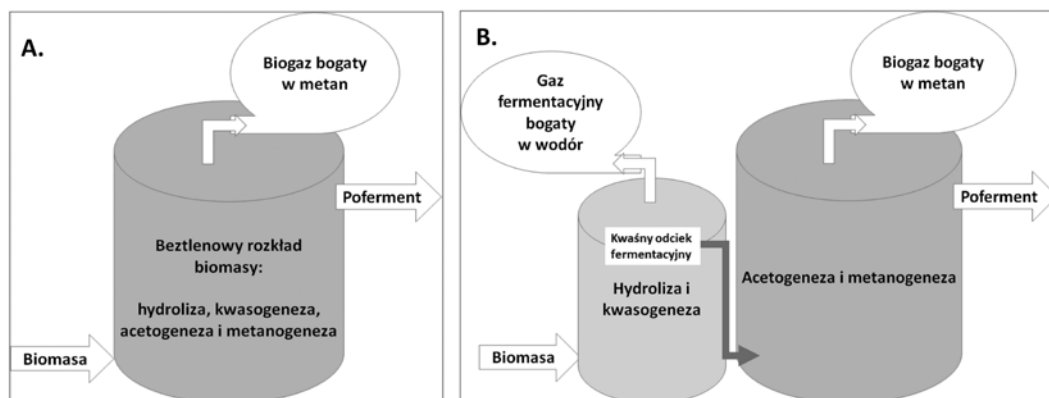
- zapewnienie specyficznych warunków dla procesu jak warunki beztlenowe,
- skład podłoża,
- oddzielenie etapu powstawania tlenu oraz konieczność zagospodarowania biomasy martwych mikroorganizmów.

- Fotofermentacja – fotosynteza w warunkach beztlenowych, prowadzona przez purpurowe bakterie beziarkowe. Fotosynteza bakteryjna w warunkach beztlenowych przebiega inaczej niż u roślin. Donorem wodoru i elektronów do wiązania ditlenku węgla nie jest woda, ale związki organiczne, głównie kwasy organiczne. W fotosyntezie bakteryjnej nie jest produkowany tlen. Do uwalniania biowodoru dochodzi podczas redukcji azotu cząsteczkowego, w wyniku aktywności nitrogenazy, która podobnie jak w przypadku sinic redukuje też protony do biowodoru cząsteczkowego. Ograniczenia procesu fotofermentacji wynikają z konieczności zapewnienia specyficznych warunków jak: oświetlenie, beztlenowość, podłoże bogate w kwasy organiczne i ubogie w azot (Sikora, 2008; Sagir i Hallenbeck, 2019).

- Ciemne fermentacje – proces będący częścią kwasogenyzy beztlenowego rozkładu materii organicznej (biomasy) (Wong i wsp., 2014, Sikora i wsp., 2017, Ghimire i wsp., 2015).

### 3. Powstawanie biowodoru na etapie kwasogenyzy beztlenowego rozkładu biomasy

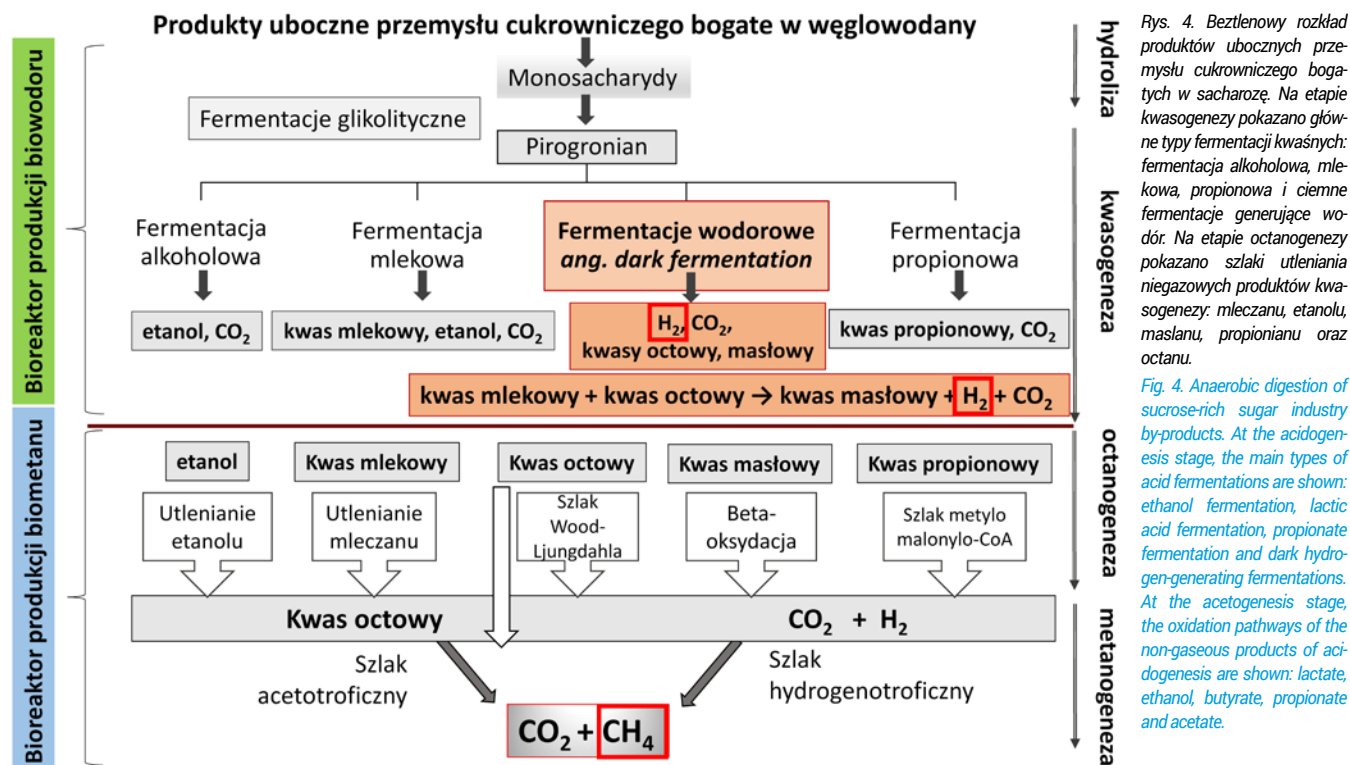
W środowiskach beztlenowych rozkład biomasy zachodzi powszechnie. Wynika on z aktywności metabolicznej wielu grup mikroorganizmów. Składa się z czterech etapów: hydrolizy polimerów do monomerów, kwasogenyzy, octanogenyzy i metanogenyzy. Końcowymi produktami procesu są metan i ditlenek węgla (biogaz). Proces ten jest podstawą krążenia materii i przepływu energii w przyrodzie, a człowiek wykorzystał go do produkcji biogazu jako odnawialnego źródła energii (rys.2). Obecność innych akceptorów



Rys. 3. Schematycznie pokazane sposoby prowadzenia beztlenowego rozkładu biomasy: A. układ jednoetapowy (hydroliza, kwasogenyza, acetogenyza i metanogenyza łącznie); B. układ dwuetapowy, gdzie hydroliza i kwasogenyza są oddzielone od acetogenyzy i metanogenyzy.

Fig. 3. Schematically shown methods of carrying out anaerobic digestion of biomass: A. one-step system (hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis combined); B. two-step system, where hydrolysis and acidogenesis are separated from acetogenesis and methanogenesis.





elektronów jak azotany, związki Fe(III) i Mn(IV) oraz siarczany hamuje przebieg beztlenowego rozkładu biomasy, selekcjonuje inne grupy mikroorganizmów i zmienia typ oddychania beztlenowego w kierunku, odpowiednio: denitryfikacji, redukcji metali czy redukcji siarczanów. Wszystkie te procesy hamują powstawanie metanu (Angenent i wsp., 2004; Liu i wsp., 2008; Sikora i wsp., 2017; Thauer i wsp., 2008).

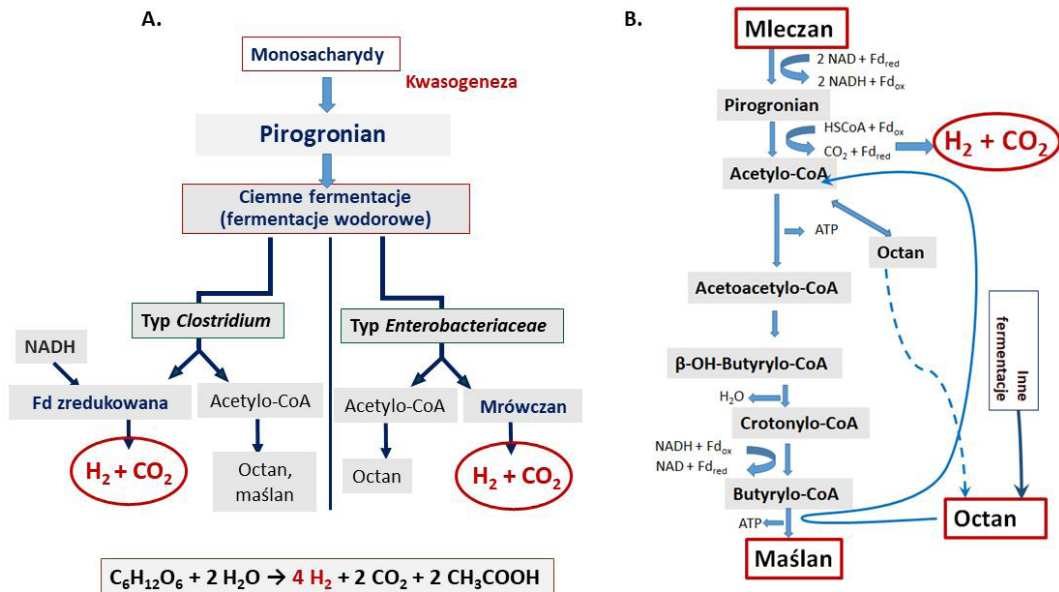
Dla prawidłowego przebiegu beztlenowego rozkładu biomasy ważny jest stosunek węgla do azotu (C/N) w substracie. Za optymalny C/N uważa się 20-30:1, gdyż mikroorganizmy rozkładają związki węgla 25-30 razy szybciej niż związki azotu. Niski C/N powoduje indukcję procesów denitryfikacji, akumulację amoniaku i zahamowanie metanogenezy. Wysoki C/N sprzyja procesom kwasogenezy, jednak niedobór azotu jest bardzo niekorzystny dla rozwoju metanogenów, które odpowiedzialne są za produkcję metanu (Yadvika et al., 2004; Rabii i wsp., 2019).

Biowodór powstaje na etapie kwasogenezy, wraz ditlenkiem węgla jest gazowym produktem ciemnych fermentacji i innych procesów zachodzących na tym etapie. Powstaje zatem pytanie jak odzyskać powstający biowodór. Należy wykorzystać fakt, że można rozdzielić etap kwasogenezy od octanogenezy i metanogenezy. Beztlenowy rozkład biomasy może być prowadzony w układach jedno- lub wieloetapowych, w których hydrolyza i kwasogeneza są oddzielone od acetogenezy i metanogenezy (rys. 3). Układ jednoetapowy polega na tym, że wszystkie 4 etapy zachodzą w jednym reaktorze, wówczas końcowym produktem będzie biogaz. Można też prowadzić wieloetapowo, oddzielając przestrzennie i czasowo etapy hydrolyzy i kwasogenezy od octanogenezy i metanogenezy (Rabii i wsp., 2019). Etapy octanogenezy i metanogenezy są ze sobą ściśle powiązane i zachodzą dzięki syntroficznym układom pomiędzy bakteriami acetogennymi a metanogenami. Podczas octanogenezy niegazowe produkty fermentacji kwaśnych utleniane są do wodoru, ditlenku węgla i octanu – substratów dla archeonów metanogennych w czwartym etapie, czyli metanogenezie.

Prowadzenie procesu beztlenowego rozkładu biomasy wieloetapowo pozwala na zwiększenie wydajności produkcji biogazu (biometanu) przez kontrolę i utrzymanie stabilnych warunków operacyjnych (pH, czasu zatrzymania), stworzenie optymalnych warunków dla selekcji i rozwoju mikroorganizmów na poszczególnych etapach, dostosowa-

wanie do konkretnych substratów. Jest to wiedza znana od ponad 50 lat (Pohland i Ghosh, 1971; Rabii i wsp., 2019). Nowatorskim jest rozwiązanie, w którym wieloetapowe prowadzenie beztlenowego rozkładu biomasy pozwala na pozyskanie gazu fermentacyjnego, bogatego w biowodór na etapie kwasogenezy i wykorzystanie ciemnej fermentacji jako metody mikrobiologicznej produkcji biowodoru. Prace badawcze wykazują, że produkcja biowodoru i metanu z biomasy odpadowej w układach dwuetapowych zwiększa odzysk energii z substratu o 20-60% w porównaniu do procesu jednoetapowego (Schievano i wsp., 2014; Luongo-Malave i wsp., 2015). Na tej zasadzie można budować biogazownie z odzyskiem biowodoru i specjalne instalacje dedykowane produkcji biowodoru i biogazu z konkretnych substratów. Ważnym i koniecznym jest ocena substratu do pracy takich układów.

Procesy zachodzące w beztlenowych bioreaktorach rozkładających biomasę są bardzo złożone. Nawet, gdy biomasa zostanie ograniczona do produktów ubocznych przemysłu cukrowniczego bogatych w sacharozę (rys. 4), to widać różnorodność procesów tam zachodzących. Dwa aspekty są bardzo ważne. Niezależnie jakie szlaki metaboliczne dominują na etapie kwasogenezy, octanogenezy i metanogenezy, końcowym produktem jest biogaz (mieszanka metanu i ditlenku węgla) (Detman i wsp., 2021a). Natomiast na etapie kwasogenezy mogą zachodzić różne typy fermentacji, nie w każdym produktem jest biowodór. Konieczne jest zatem opracowanie warunków dla selekcji ciemnych fermentacji i innych procesów, jak konwersja mleczanu i octanu do maślanu, w wyniku których produkowany jest biowodór (rys. 5). Ciemne fermentacje należą do fermentacji glikolitycznych, których istotnym produktem pośrednim jest pirogronian. Wyróżniamy dwa typy tych fermentacji: typ *Clostridium* i typ *Enterobacteriaceae* (rys. 5A). Maksymalną teoretyczną wydajność produkcji biowodoru metodą ciemnej fermentacji uzyskujemy dla fermentacji typu *Clostridium*. Wynosi ona 4 mole biowodoru na mol glukozy, pod warunkiem, że jedynym produktem niegazowym jest kwas octowy. W rzeczywistych warunkach wydajności są niższe (Hallenbeck, 2009; Hallenbeck i Ghosh, 2009; Nasr i wsp., 2017; Maeda i wsp., 2018). Konwersja mleczanu i octanu do maślanu, biowodoru i ditlenku węgla (rys. 5B) wynika z symbiotycznych układów pomiędzy bakteriami kwasu mlekowego a bakteriami produkującymi biowodór, głównie z rodzaju *Clostridium* znanego w literaturze naukowej jako „Cross-feeding of lactate” i opisanego po raz



Rys. 5. Szlaki metaboliczne produkcji biowodoru na etapie kwasogenezy:

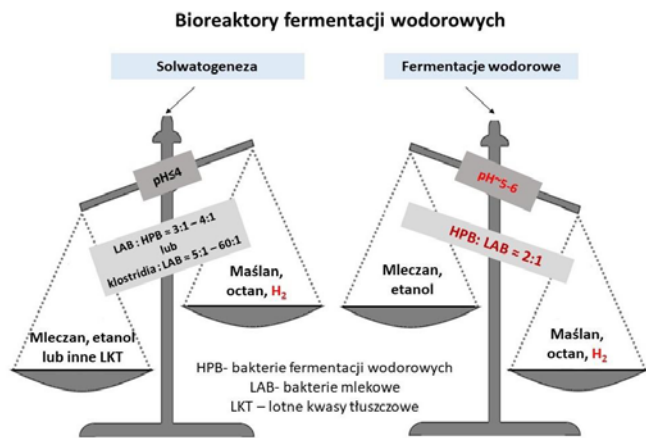
A. Dwa typy ciemnych fermentacji. W fermentacji typu Clostridium pirogronian przekształcany jest do acetylo-koenzymu A przy udziale ferredoksyny (Fd), która ulega redukcji. Zredukowana ferredoksyna (Fd red) powstaje również w reakcji z NADH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma zredukowana). Ze zredukowanej ferredoksyny uwalniany jest wodór przy udziale hydrogenaz. W fermentacji typu Enterobacteriaceae pirogronian przekształcany jest do mrówczanu i acetylo-koenzymu A. Wodór powstaje w wyniku rozkładu mrówczanu;

B. Konwersja mleczanu i octanu do maślanu, wodoru i ditlenku węgla. Mleczan, produkt bakterii kwasu mlekowego, i octan przekształcane są przez bakterie produkujące wodór do maślanu, w reakcji uwalniany jest wodór.

Fig. 5. Metabolic pathways of bio-hydrogen production during acidogenesis:

A. Two types of dark fermentations. In Clostridium-type fermentation, pyruvate is converted to acetyl-coenzyme A and ferredoxin (Fd) is reduced. Reduced ferredoxin (Fd red) is also formed by reaction with NADH (dinucleotide nicotynoamidoadeninowy, forma zredukowana). From the reduced ferredoxin, hydrogen is released by hydrogenases. In Enterobacteriaceae-type fermentation, pyruvate is converted to formate and acetyl-coenzyme A. Hydrogen is formed by the decomposition of formate;

B. Conversion of lactate and acetate to butyrate, hydrogen and carbon dioxide – lactate, a product of lactic acid bacteria, and acetate are converted by hydrogen-producing bacteria to butyrate, and hydrogen is released in the reaction.



Rys. 6. Podsumowanie badań własnych na temat równowagi pomiędzy bakteriami w bioreaktorach produkcji biowodoru na podłożu z melasą buraczaną. Po prawej bioreaktory o wysokiej produkcji wodoru (>100 cm<sup>3</sup> biowodoru/g ChZT melasy), po lewej (<50 cm<sup>3</sup> biowodoru/g ChZT melasy) na podstawie pracy Detman i wsp., 2021b.

Fig. 6. Summary of self-research on the balance of bacteria in sugar beet molasses-processing biohydrogen-producing bioreactors. On the right, bioreactors with high hydrogen production (>100 cm<sup>3</sup> biohydrogen/g COD of molasses), on the left (<50 cm<sup>3</sup> biohydrogen/g COD of molasses) (Detman et al., 2021b).

pierwszy dla bakterii izolowanych z przewodu pokarmowego (Sikora i wsp., 2013; García-Depraect i León-Becerril, 2018; García-Depraect i wsp., 2019a; García-Depraect i wsp., 2019b).

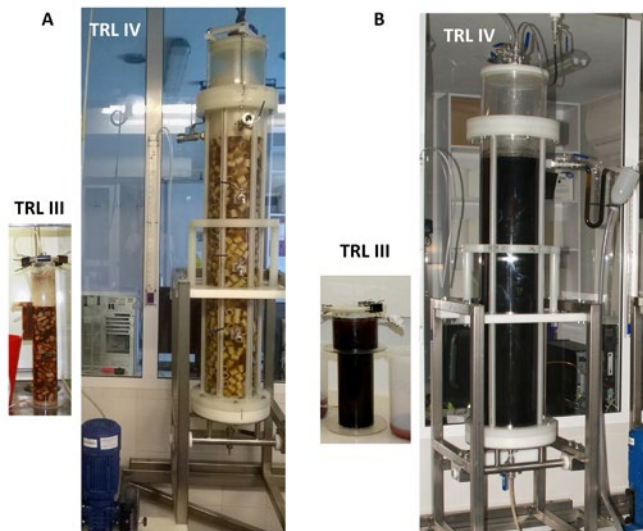
Nasze badania wniosły istotny wkład do wiedzy nad produkcją biowodoru na etapie kwasogenezy. Potwierdziliśmy zdolność wspólnoty bakterii ciemnej fermentacji do transformacji mleczanu i octanu do maślanu, określiliśmy warunki tego procesu i wykazaliśmy, że jest to

istotny szlak metaboliczny produkcji biowodoru. Zidentyfikowaliśmy równowagę pomiędzy bakteriami kwasu mlekowego a bakteriami fermentacji wodorowych (1:2) we wspólnocie stabilnie i efektywnie produkującej biowodór. Stwierdziliśmy, że warunki techniczne i operacyjne (pH, HRT, skład i podawanie substratu, konstrukcja bioreaktora, typ złoża zatopionego) determinują procesy generujące biowodór (rys. 6) (Detman i wsp., 2019, Detman i wsp., 2021b, 2021c). Wyniki naszych badań potwierdzają doniesienia literaturowe innych grup badawczych.

#### 4. System produkcji biowodoru i biogazu (biometanu) na drodze beztlenowego rozkładu produktów ubocznych przemysłu cukrowniczego.

W literaturze naukowej można znaleźć wiele publikacji pokazujących produkcję biowodoru metodą ciemnej fermentacji z metanizacją niegazowych produktów fermentacji (Wu i wsp., 2015; Intanoo i wsp., 2014; Luongo-Malave i wsp., 2015; Sen i wsp., 2016). Prezentowane są układy stacjonarne, w bioreaktorach o skali laboratoryjnej ok. 1 l, często o mniejszych objętościach lub hodowle ciągłe zwykle w dwóch typach bioreaktorów (CSTR – continuously stirred tank reactor, PBR – packed-bed reactor). Czas prowadzenia eksperymentów jest różny, często dość krótki. Pokazywane są hodowle pojedynczych szczepów lub konsorcjów na różnorodnych substratach w warunkach mezofilnych i termofilnych.

W IBB PAN opracowaliśmy w skali laboratoryjnej efektywny dwuetapowy system otrzymywania biowodoru i następnie biogazu (biometanu) z produktu ubocznego (melasy buraczanej), produktów pośrednich i odcieków cukrowniczych w wyniku ich beztlenowego rozkładu przez wyselekcjonowane i scharakteryzowane przez nas wspólnoty mikroorganizmów, pracujący w systemie ciągłym w warunkach mezofilnych. Instalacja posiada poziom gotowości technologicz-



Rys. 7. Skalowanie bioreaktorów w trakcie rozwoju dwuetapowej instalacji produkcji biowodoru i biometanu (biogazu) z poziomu TRLIII (Chojnacka i wsp., 2011; 2015) do TRLIV (Detman i wsp., 2017).

Fig. 7. Scaling up bioreactors during the development of a two-stage biohydrogen and biomethane (biogas) production facility from TRLIII (Chojnacka et al., 2011; 2015) to TRLIV (Detman et al., 2015).

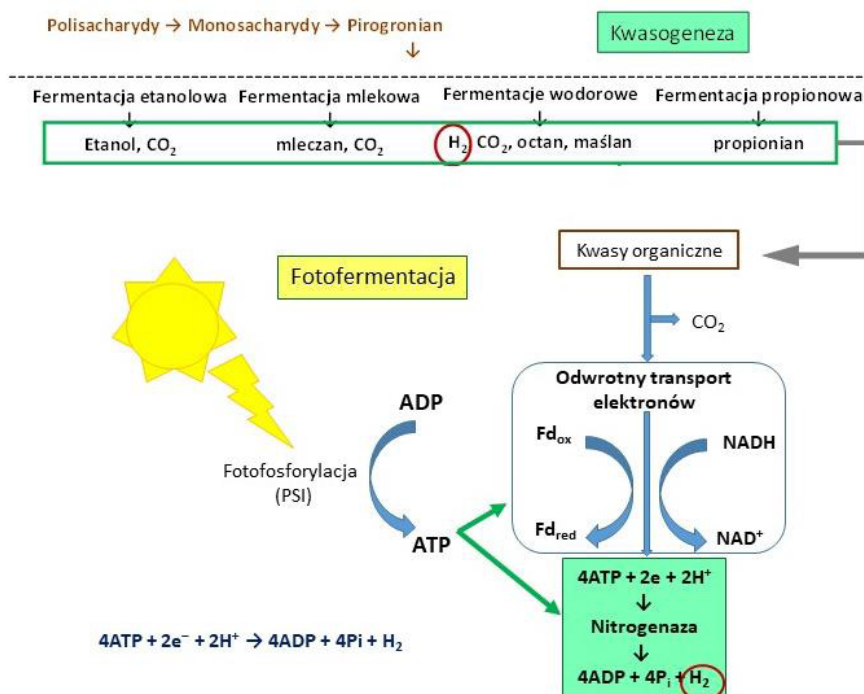
nej TRL III. Jest to układ dwóch bioreaktorów o objętości całkowitej 3-4 l. Pierwszy to bioreaktor typu beztlenowe złożone zatopione dla fermentacji wodorowych, do którego dostarczamy podłoże z melasy buraczanej, produktem ubocznym przemysłu cukrowniczego. Produkowany jest gaz fermentacyjny bogaty w biowodor przez wyselekcjonowaną wspólnotę bakterii, której pierwotnym źródłem był osad jeziora meromiktycznego. Drugi to bioreaktor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) do procesów metanogenezy. Metanizacji podlega kwaśny odciek po fermentacji melasy. Źródłem mikroorganizmów metanogennych był beztlenowy osad z oczyszczalni ścieków. Cały układ mieści się pod wyciągiem laboratoryjnym wraz z aparaturą analityczną może pracować w standardowym pomieszczeniu laboratoryjnym. Dla pracy bioreaktorów istotne są czas zatrzymania substratu, stężenie substratu, okresowa neutralizacja odcieku przed poddaniem go metanizacji. Najefektywniejszymi substratami okazały się melasa

jako produkt uboczny oraz odciek I, odciek afinacyjny i odciek II jako media powstające przy produkcji cukru. Instalacja ta produkuje biowodor w ilości 54.0 – 68.6 dm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>/ kg ChZT melasy oraz biometan w ilości 243 – 306 dm<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/ kg ChZT melasy (Zgiep, 2008; Sikora i wsp., 2009; 2010; Chojnacka i wsp., 2011; Chojnacka i wsp., 2015; Sikora i wsp., 2021).

Opisana powyżej instalacja TRLIII została przeskalowana 10-krotnie w ramach projektu Programu Badań Stosowanych finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (rys 7). Na potrzeby tej instalacji powstało nowe w pełni wyposażone laboratorium zdolne do pracy ciągłej (7 dni w tygodniu) w adaptowanych pomieszczeniach Laboratorium Surowcowego Cukrowni Dobrzelin Krajowej Spółki Cukrowej S.A. (obecnie Krajowa Grupa Spożywcza S.A.). Taka skala wymagała laboratorium posiadającego odpowiednie środki bezpieczeństwa, wentylacji, systemu monitorowania stężeń wodoru i metanu, wydzielenia strefy zagrożonej wybuchem, zabezpieczeń przeciwpożarowych, instalacji elektrycznej w systemie Ex. Osiągnięto wydajności 60.0–122.0 dm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>/kg ChZT melasy oraz 282.6 – 323.9 dm<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg ChZT melasy (Detman i wsp., 2017; Sikora i wsp., 2021).

Opisana powyżej instalacja TRLIV została powiększona do skali ćwierć- i półtechnicznej, co odpowiada 20- i 200-krotnemu przeskalowaniu pracującej instalacji TRLIV. Były to wspólne działania IBB PAN i KGS S.A., w ramach projektu programu BIOSTRATEG NCBiR. W ten sposób powstała instalacja o poziomie gotowości technologicznej TRLV, jako nowy kilkumodułowy obiekt na terenie oczyszczalni ścieków Cukrowni Dobrzelin. Kolejne przeskalowanie dało zbliżoną wydajność procesu w odniesieniu do substratu – melasy buraczanej (Sikora i wsp., 2021).

Przy projektowaniu i uruchamianiu tego typu instalacji ważna jest ocena substratu. Nasze doświadczenia pokazują, że nawet substraty pochodzące z przemysłu cukrowniczego bardzo się różnią. I tak np. wody spławiakowe, z hydraulicznego transportu buraków cukrowych, mają niski poziom sacharozy, wymagają sedymentacji i oddzielenia błota spławiakowego, ponadto niosą konkurencyjne dla bakterii ciemnych fermentacji mikroorganizmy typu drożdże. Wody te stanowią za to świetny substrat dla produkcji biogazu w systemie jednostopniowym (cztery etapy beztlenowego rozkładu w jednym). Przy beztlenowym rozkładzie innego substratu, tj. wysłoków buraczanych, obserwuje się selekcję fermentacji alkoholowej i mlekowej na etapie kwasogenezy, czyli również procesów konkurencyjnych dla ciemnych fermentacji.



Rys. 8. Układ dwuetapowy produkcji biowodoru przez połączenie ciemnych fermentacji (kwasogenezy) i fotofermentacji. Proces fotofermentacji prowadzony jest przez bakterie fotosyntetyzujące beziarkowe purpurowe, które rozkładają kwasy organiczne do ditlenku węgla i wodoru przy udziale energii świetlnej. Najpierw powstaje NADH wykorzystywane do redukcji ferredoksyny (Fd) przez odpowiednie kompleksy enzymatyczne a siła protomotoryczna do tych procesów w postaci ATP pochodzi z energii świetlnej. Ferredoksyna jest dawcą elektronów dla nitrogenazy, która przy udziale ATP redukuje protony do wodoru zgodnie z podaną reakcją.

Fig. 8. A two-step system for the production of biohydrogen by a combination of dark fermentation (acidogenesis) and photo-fermentation. The photo-fermentation process is carried out by purple sulfur-free photosynthetic bacteria, which break down organic acids into carbon dioxide and hydrogen with the use of light energy. First, NADH is produced that is used for the reduction of ferredoxin (Fd) by specific enzyme complexes and the proton motive force for these processes in the form of ATP comes from light energy. Ferredoxin is the electron donor for nitrogenase, which, with the participation of ATP, reduces protons to hydrogen according to the given reaction.



Te obserwacje potwierdzone są również przez inne grupy badawcze (Kapela i Markowski, 2019a; 2019b). Natomiast najwydajniejszym dla procesów produkcji biowodoru okazują się odcieki cukrownicze oraz melasa buraczana, testowane w wyżej opisanej instalacji TRL III.

## 5. Wyzwania i ograniczenia produkcji biowodoru na etapie kwasogenezy

Pozyskiwanie biowodoru na etapie kwasogenezy w wyniku ciemnych fermentacji uważane jest za obiecującą metodę produkcji tego cennego nośnika energii. Prace własne i doniesienia literaturowe pokazują, że istnieją różnorodne problemy związane z produkcją biowodoru metodą ciemnych fermentacji na etapie kwasogenezy, pokonanie których jest niezbędne, aby nastąpił rozwój i wdrażanie technologii. Należą do nich:

- (i) Niska wydajność produkcji biowodoru (teoretyczna maksymalna 33%) na drodze ciemnej fermentacji jak pokazano za pomocą równania opisującego proces na rys. 5.
- (ii) Konkurencja o substrat pomiędzy mikroorganizmami i zmiany dominującego typu fermentacji. Różnorodność możliwych do zajścia fermentacji pokazano na rys. 4.
- (iii) Ustalenie i utrzymanie warunków technicznych pracy bioreaktorów dla optymalnego rozwoju bakterii produkujących biowodor, w sposób stabilny w długotrwałych układach ciągłych.
- (iv) Utrzymanie swoistej równowagi pomiędzy producentami biowodoru a bakteriami kwasu mlekowego (Detman i wsp., 2021b; 2021c).
- (v) Produkcja czynników hamujących wzrost jednych mikroorganizmów przez inne (Detman i wsp., 2018).

Powody niedojrzałości technologii produkcji biowodoru i pozostawanie ich ciągle na etapie badawczo-rozwojowym, w porównaniu do zaawansowanych, skomercjalizowanych i wdrażanych rozwiązań produkcji biogazu, to:

- (i) Wymienione powyżej problemy i ograniczenia natury biologicznej produkcji biowodoru;
- (ii) Biogaz zawierający biometan jest produktem końcowym beztlenowego rozkładu biomasy, niezależnie od dominującego typu fermentacji na etapie kwasogenezy; produkcję biowodoru determinuje typ fermentacji kwaśnych;
- (iii) Konieczność zagospodarowania niegazowych produktów fermentacji w układach dwuetapowych. Najczęściej jest to propozycja połączenia procesów ciemnej fermentacji i metanizacji kwaśnego odcieku fermentacyjnego. Inną propozycją jest połączenie procesów fermentacji i fotofermentacji. Tworzy się także układy dwuetapowe, w których najpierw mają miejsce ciemne fermentacje, a potem kwasy organiczne nie są poddawane metanizacji, ale stanowią substrat dla bakterii fotosyntetyzujących produkujących biowodor w procesie fotofermentacji (rys.8) (Mishra i wsp., 2009; Ghosh i wsp., 2018).
- (iv) Biogaz można zastosować bezpośrednio w agregatach kogeneracyjnych, bez konieczności rozdziału biometanu od ditlenku węgla. Obecne zastosowania wodoru na cele energetyczne (wodorowe ogniwa paliwowe, silniki wodorowe), czy wykorzystanie w przemyśle chemicznym, m.in. do produkcji amoniaku, w reakcjach redukcji i uwodornienia, wymagają uzyskania gazu o wysokiej czystości. Gaz fermentacyjny zawiera 35-50% biowodoru.

Do znanych metod wydzielania wodoru z mieszaniny gazów należą: elektrochemiczna separacja wodoru, adsorpcja zmiennociśnieniowa (PSA – pressure swing adsorption), separacja membranowa. Proponowana jest również kriotechnika wykorzystywana do rozdziału różnych mieszanin gazowych (Janusz-Szymańska i Kotowicz, 2020; Smoliński i Howaniec, 2006; Janocha, 2022). Proces kriogeniczny wymieniany jest natomiast wśród metod uzyskiwania czystego wodoru z gazu koksowniczego. Wg wiedzy Auterek rozdział kriogeniczny wodoru od ditlenku węgla nie był nigdy wcześniej zastosowany do oczyszczania biowodoru na większą skalę oprócz prób wykonanych w ramach pro-

jektu BIOSTRATEG2/297310/13/NCBiR/2016 przez zespół badaczy z Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie, Krajowej Grupy Spożywczej S.A i Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Prace odbyły się na terenie Cukrowni Dobrzelin (KGS S.A.). Uzyskaliśmy maksymalną czystość biowodoru 97.87% w oczyszczanym gazie (dane niepublikowane, dostępne w raporcie rocznym projektu, 2018).

## 6. Uwagi końcowe

Mikrobiologiczna produkcja biowodoru jest bardzo ciekawym kierunkiem prac badawczo-rozwojowo-wdrożeniowych. Wymagają one zintegrowanych działań specjalistów różnych dziedzin: mikrobiologów, technologów procesowych, inżynierów i chemików. Prace nad rozwojem tego typu technologii wpisują się w POLSKĄ STRATEGIĘ WODOROWĄ DO ROKU 2030 Z PERSPEKTYWĄ DO ROKU 2040 (Załącznik do uchwały nr 149 Rady Ministrów z dnia 02.11.2021 r. poz. 1138). Jednym z sześciu celów POLSKIEJ STRATEGII WODOROWEJ jest PRODUKCJA nisko – i zeroemisyjnego WODORU W NOWYCH INSTALACJACH. Dokument zwraca uwagę, że najbardziej optymalnymi formami produkcji wodoru są m.in. te realizowane możliwie jak najbliżej źródeł oraz centrów popytu, umożliwiając zaspokajanie miejscowego zapotrzebowania na energię w sektorze transportu i/lub produkcji przemysłowej oraz równoważenie produkcji energii elektrycznej i produkcji ciepła. Warunkiem rozwoju innowacyjnych technologii produkcji biowodoru i innych bioproduktów spełniających te kryteria jest współpraca nauki i przemysłu polegająca na przenoszeniu wyników prac naukowców i rozwiązań w skali mini z laboratoriów instytutów naukowych i uczelni do partnerów przemysłowych, a tam dalszy ich rozwój i podnoszenie do wyższych poziomów gotowości technologicznej. Doskonałym przykładem takich działań jest współpraca pomiędzy Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN a Krajową Grupą Spożywczą S.A. (wcześniej Krajowa Spółka Cukrowa S.A.).

## 7. Podziękowania

Powyższy artykuł powstał jako refleksja po realizacji szeregu projektów badawczych na temat pozyskiwania biowodoru i biometanu z procesów mikrobiologicznych, zwłaszcza z beztlenowego rozkładu produktów ubocznych i odpadów przemysłu cukrowniczego: granty z zakresu nauk podstawowych: MNiSW – 2P04B00429 (2005-2009), NN302293836 (2009-2011), IP2011006571 (2012-2014); NCN – 2015/17/B/NZ9/01718 (2016 – 2020) oraz z zakresu R&D: NCBiR: PBS 1/B9/9/2012 (2012-2016); BIOSTRATEG2/297310/13/NCBiR/2016 (2016-2021). Szczególne podziękowania należą się osobom z Krajowej Grupy Spożywczej zaangażowanych w prace R&D: mgr inż. Jan Piotrowski, mgr inż. Ewa Wiktorowska-Sowa, dr inż. Szymon Nowak, dr inż. Marcin Szewczyk, mgr inż. Marcin Nosek. ■

## LITERATURA

- Abdalla M. Abdalla, Shahzad Hossain, Ozzan B. Nisfindy, Atia T. Azad, Mohamed Dawood, Abul K. Azad. 2018. "Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review" *Energy Conversion and Management* 165: 602-627
- Angenent LT, Karim K, Al-Dahhan MH, Wrenn BA, Domiguez-Espinosa r. 2004. "Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater" *Trends in Biotechnol.* (22):477-485 .
- Chojnacka A., Błaszczyk M.K., Szczęśny P., Nowak K., Sumińska M., Tomczyk-Żak K., Zielenkiewicz U., Sikora A. 2011 "Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria" *Bioresource Technology* (102):10057-10064
- Chojnacka A., Szczęśny P., Błaszczyk M.K., Zielenkiewicz U., Detman A., Salamon A., Sikora A. 2015. "Noteworthy facts about a methane-producing microbial community processing acidic effluent from sugar beet molasses fermentation" *PLoS One*, 10, e0128008
- Detman A, Chojnacka A, Błaszczyk MK, Kaźmierczak W, Piotrowski J, Sikora A. 2017. "Biohydrogen and biomethane (biogas) production in the consecutive stages of anaerobic digestion of molasses" *Pol. J. Environ. Stud.* (26):1023-1029 .

- Detman A, Chojnacka A, Mielecki D, Błaszczyk MK, Sikora A. 2018. "Inhibition of hydrogen-yielding dark fermentation by ascomycetous yeasts." *Int J Hydrogen Energy* (43):10967-10979 .
- Detman A., Bucha M., Treu L., Chojnacka A., Pleśniak L., Salamon A., Łupikasza E., Gromadka R., Gawor J., Gromadka A., Drzewicki W., Jakubiak M., Janiga M., Matyasik I., Błaszczyk M.K., Jędrzysek M.O., Campanaro S., Sikora A., *Evaluation of acidogenesis products' effect on biogas production performed with metagenomics and isotopic approaches*. *Biotechnology for Biofuels*, 14, (2021a), 125.
- Detman A, Laubitz D, Chojnacka A, Wiktorowska-Sowa E, Piotrowski J, Salamon A, Kaźmierczak W, Błaszczyk MK, Barberan A, Chen Y, Łupikasza E, Yang F, Sikora A. 2021b. "Dynamics and complexity of dark fermentation microbial communities producing hydrogen from sugar beet molasses in continuously operating packed bed reactors" *Frontiers in Microbiology* (11)612344
- Detman A, Laubitz D, Chojnacka A, Kiela PR, Salamon A, Barberán A, Chen Y, Yang F, Błaszczyk MK, Sikora A. 2021c. "Dynamics of dark fermentation microbial communities in the light of lactate and butyrate production". *Microbiome*, 9, 158.
- Detman A, Mielecki D, Chojnacka A, Salamon A, Błaszczyk MK, Sikora A. 2019. "Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: Clostridium butyricum and microbial communities from dark fermentation bioreactors". *Microbial Cell Factories* 18:36.
- Fakhimi, Neda, David Gonzalez-Ballester, Emilio Fernández, Aurora Galván, and Alexandra Dubini. 2020. "Algae-Bacteria Consortia as a Strategy to Enhance H<sub>2</sub> Production" *Cells* 9, no. 6: 1353.
- García-Depraect, O., and León-Becerril, E. 2018. "Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology". *Fuel* 234, 151-160 .
- García-Depraect, O., Rene, E.R., Diaz-Cruces, V.F., and León-Becerril, E. 2019a. "Effect of process parameters on enhanced biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway". *Bioresour. Technol.* 273, 618-626 .
- García-Depraect, O., Valdez-Vázquez, I., Rene, E.R., Gómez-Romero, J., López-López, A., and León-Becerril, E. 2019b. "Lactate-and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics". *Bioresour. Technol.* 282, 236-244 .
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, r., Lens, P.N.L., et al. 2015. "A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products". *Applied Energy* 144, 73-95.
- Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A.: 2000. "Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>". *Trends Biotechnol* (18):506-511.
- Ghosh Shiladitya, Ranjana Chowdhury, Pinaki Bhattacharya, 2018. "A review on single stage integrated dark-photo fermentative biohydrogen production: Insight into salient strategies and scopes". *International Journal of Hydrogen Energy* (43) : 2091-2107.
- Hallenbeck, P.C. 2009. "Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int. J.*" *Hydrogen Energy* 34(17), 7379-7389 .
- Hallenbeck, P.C., and Ghosh, D. 2009. "Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?" *Trends Biotechnol.* 27(5), 287-297 .
- Intanoo Patcharee, Pramoch Rangsanvigit, Pomthong Malakul, Sumaeth Chavadej, 2014. "Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation" *Bioresour. Technol.* 173, 256-265.
- Janocha Andrzej. 2022. "Rodzaje zanieczyszczeń i sposoby oczyszczania wodoru magazynowanego w kavernach solnych w aspekcie zastosowania go w urządzeniach wytwarzających energię (types of impurities and methods of purifying hydrogen stored in salt caverns in terms of application to energy generating devices)" *Nafta-Gaz* (4):288-298.
- Janusz-Szymańska K., Kotowicz J. 2020. "Wychwył wodoru z gazu ziemnego przy użyciu technologii membranowych". *Rynek energii* (5): 33-37 .
- Kapela T, Markowski K. 2019. "Sposób wytwarzania etanolu, biogazu i materiałów nawozowych z procesu przetwarzania buraków i wysłodków buraczanych". Patent P.431783.
- Kapela T, Markowski K. 2019. "Sposób wytwarzania kwasu mlekowego, biogazu i materiałów nawozowych z procesu przetwarzania buraków i wysłodków buraczanych". Patent Pat.239863.
- Li Shengnan, Fanghua Li, Xun Zhu, Qiang Liao, Jo-Shu Chang, Shih-Hsin Ho, Biohydrogen production from microalgae for environmental sustainability, *Chemosphere* Volume 291, Part 1, 2022, 132717.
- Liu Y, Whitman WB. 2008. "Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea". *Ann NY Acad Sci.* 1125:171-189.
- Luongo Malave Andrea Cristina, Milena Bernardi, Debora Fino, Bernardo Ruggeri. "Multistep anaerobic digestion (MAD) as a tool to increase energy production via H<sub>2</sub> + CH<sub>4</sub>". *International Journal of Hydrogen Energy* (40): 5050-5061.
- Maeda, T., Tran, K.T., Yamasaki, r., and Wood, T.K. 2018. "Current state and perspectives in hydrogen production by *Escherichia coli*: roles of hydrogenases in glucose or glycerol metabolism". *Appl Microbiol. Biotechnol.* 102(5):2041-2050.
- Mishra Puranjan, Santhana Krishnan, Supriyanka Rana, Lakhveer Singh, Mimi Sakinah, Zularisam Ab Wahid, 2019. "Outlook of fermentative hydrogen production techniques: An overview of dark, photo and integrated dark-photo fermentative approach to biomass." *Energy Strategy Reviews* (24) 27-37.
- Nasr, N., Gupta, M., Hafez, H., El Naggar, M.H., and Nakhla, G. 2017. "Mono – and co-substrate utilization kinetics using mono – and co-culture of Clostridium beijerinckii and Clostridium saccharoperbutylacetonicum. *Bioresour* ". *Technol.* 241, 152-160.
- Nicklin J, Graeme-Cook K, Killington R, Krótkie wykłady. *Mikrobiologia*. Wydanie drugie, przekład zbiorowy pod redakcją Zdzisława Markiewicza. Warszawa 2004, Wydawnictwa Naukowe PWN.
- Piela P., Zelenay P. 2004. "Researchers redefine the DMFC roadmap. *The Fuel Cell Review*, 1, 17-23.
- Pinto F.A.L., Troshina O., Lindblad P. 2002. "A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution". *Int. J. Hydrogen Energy* (27)1209-1215 .
- Pitula M. Biowodór – paliwo przyszłości. Raport „Biogaz w Polsce 2020”. [www.magazynbiomasa.pl](http://www.magazynbiomasa.pl)
- Pohland F. G. and Ghosh S. 1971. "Developments in anaerobic treatment processes". *Biotechnol. Bioengng. Symp.* 2, 85–106.
- Rabii A, Aldin S, Dahman Y, Elbeshbishy E. 2019. "A Review on Anaerobic Co-Digestion with a Focus on the Microbial Populations and the Effect of Multi-Stage Digester Configuration ". *Energies* 12, 1106.
- Sagir Emrah, Patrick C. Hallenbeck, Chapter 6 – Photofermentative Hydrogen Production, Editor(s): Ashok Pandey, S. Venkata Mohan, Jo-Shu Chang, Patrick C. Hallenbeck, Christian Larroche. 2019 . "In Biomass, Biofuels, Biochemicals, Biohydrogen (Second Edition)". Elsevier, , Pages 141-157, ISBN 9780444642035.
- Schievano, A. Tenca, A. Lonati, S. Manzini, E. Adani, F. 2014. "Can two-stage instead of one-stage anaerobic digestion really increase energy recovery from biomass?" *Applied Energy*, 124©, 335-342.
- Sen Biswarup, J. Aravind, P. Kanmani, Chyi-How Lay. 2016. "State of the art and future concept of food waste fermentation to bioenergy". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (53) 547-557.
- Sikora A, Chojnacka A, Błaszczyk MK. Sposób wytwarzania gazu bogatego w wodor. Wniosek patentowy złożony w Urzędzie Patentowym RP. Zgłoszenie patentowe nr PL20090388303 20090617. Numer publikacji: PL388303 (A1). Data publikacji: 20.12.2010.
- Sikora A. "Produkcja wodoru w procesach prowadzonych przez drobnoustroje". *Postępy Mikrobiologii* (47): 465-482.
- Sikora A., Chojnacka A., Zielenkiewicz U., Tomczyk K., Piela P., Grzesiuk E. and Błaszczyk M.K.: Hydrogen production by continuous culture of fermentative bacteria on waste substrates 2<sup>nd</sup> Central European Forum for Microbiology (CEFoRM), Keszthely, WĘGRY, 7-9 października 2009 r., Materiały zjazdowe, str. 238.
- Sikora A., Detman A., Chojnacka A., Błaszczyk M. 2017. Anaerobic digestion: I. A common process ensuring energy flow and the circulation of matter in ecosystems. II. A tool for the production of gaseous biofuels, [w:] Jozala A. (red.), *Fermentation processes*, In Tech, Rijeka, , 271-301.
- Sikora A., Detman A., Wiktorowska-Sowa E., Nosek M., Szweczyk M., Nowak Sz., Piotrowski J., 2021. "Beztlenowy rozkład produktów ubocznych i odpadowych przemysłu cukrowniczego jako źródło biopaliw gazowych, rozdział w: *Nauki ścisłe i przyrodnicze – przegląd wybranych zagadnień*" Wydawnictwo Naukowe Tygiel. Red. J. Jędrzejewska, A. Danielewska; ISBN 978-83-67104-13-5, s. 189-203.
- Sikora, A., Błaszczyk, M., Jurkowski, M., and Zielenkiewicz, U. 2013. "Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: on purpose or by coincidence?," in *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, ed. J.M. Kongo. (Rijeka, Croatia: InTech) 487-514.
- Smoliński Adam, Natalia Howaniec. 2006. "Produkcja wodoru, z wydzieleniem dwutlenku węgla przygotowanego do sekwestracji jako perspektywiczne rozwiązanie technologiczne". *Prace Naukowe GIG Górnictwo I Środowisko* 3, 5-21 .
- Thauer RK, Kaster A-K, Seedorf H, Buckel W, Hedderich r. 2008. "Methanogenic Archaea: ecologically relevant differences in energy conservation". *Nat Rev Microbiol.* 6:579-591.
- Wong, Yee Meng Ta Yeong Wu, Joon Ching Juan, 2014. "A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (34): 471-482.
- Wu Li-Jie, Takuro Kobayashi, Yu-You Li, Kai-Qin Xu, 2015. "Comparison of single-stage and temperature-phased two-stage anaerobic digestion of oily food waste". *Energy Conversion and Management* (106)1174-1182.
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T.R., Kohli, S., Rana, V. 2004. "Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – a review". *Bioresour. Tech.* (95): 1-10.
- Zgiep (obecnie Chojnacka Aleksandra), 2008. "Produkcja wodoru przez bakterie w procesach fermentacyjnych" Praca magisterska.