

УДК 579.088; 158.54

І.А. Самаруха

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ БЕЗМЕДІАТОРНОГО БІОЕЛЕКТРОГЕНЕЗУ АСОЦІАЦІЮ АНАЕРОБНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ*

We develop the approaches to classification of technological parameters of effectiveness evaluation of the mediatorless exoelectrogenesis process based on the system features. Moreover, we propose the ways of calculating the efficiency of biotechnological process parameters, namely the biomass growth (total and specific), the rate of substrate consumption (efficiency of wastewater purification), Coulomb efficiency and COD balance. Finally, we experimentally justify the possibility of biotechnological electricity generation using the association of anaerobic microorganisms on the laboratory equipment of the mediatorless microbial fuel cell.

Вступ

З біоелектрохімічної точки зору процес життя можна розглядати як низку актів обміну електронами і електронних потоків: живі організми вилучають і переносять енергію у вигляді електронів з будь-якого різноманіття субстратів, а також використовують енергію цих електронів для створення біологічно корисної енергії [1].

Особливий інтерес становлять біоелектрохімічні процеси у мікроорганізмах завдяки перспективності їх прикладного застосування в біотехнології та біоенергетиці. Попередні дослідження, в яких використовувалися бактерії [2–4] і в яких було досягнуто високих значень питомої електричної потужності, показали, що мікроорганізми потребують додавання переносників електронів, або медіаторів, для перенесення електронів на електрод. Встановлення того факту, що бактерії здатні до дисиміляції відновленого заліза та генерації електричної енергії за відсутності екзогенних медіаторів, передбачає, що продукування електроенергії є рідкісною ознакою, притаманною лише певним видам мікроорганізмів. Також було показано, що до генерації струму здатні різні мікробні угруповання, що було несподіваним, якщо зважати на очевидну необхідність клітин мати можливість дихати з використанням електрода [5].

Дослідження з використанням чистих культур підтвердили, що багато різних бактерій в анодній біоплівці можуть виробляти електроенергію. Продукування електричного струму спостерігалось у чотирьох з п'яти класів протеобактерій, а також у *Firmicutes* і *Acidobacteria phyla*. У дріжджах *Anomala pichia* виявлено на-

явність окисно-відновних ферментів на зовнішній мембрані. Також здатні продукувати струм у мікробному паливному елементі (МПЕ) і аеробні фототрофні ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, в яких було виявлено здатність до виробництва електропровідних додатків, що називаються нанопроводами [6].

Мікроорганізми, які здатні до екзоклітинного перенесення електронів, називаються екзоелектрогенами, хоча вони можуть бути описані із застосуванням й інших термінів, наприклад таких, як електрохімічно активні бактерії, анод-дихаючі бактерії та електрогени. З метою оцінки ефективності продукування ними електроенергії необхідно розробити підходи до класифікації технологічних показників процесу безмедіаторного екзоелектрогенезу, базуючись на особливості розроблюваної системи, чому і присвячена дана стаття.

Постановка задачі

Метою дослідження є напрацювання підходів до класифікації технологічних показників оцінки процесу безмедіаторного екзоелектрогенезу та проведення експериментального дослідження процесу отримання електричної енергії за допомогою асоціації анаеробних мікроорганізмів.

Матеріали і методи

Асоціація мікроорганізмів і умови культивування. Для дослідження було використано асоціацію мікроорганізмів відстояного активного мулу, взятого з Бортницької станції аерації (ВАТ

*Матеріали статті є частиною роботи, яка була підтримана грантом, отриманим на VI-му конкурсі на одержання фінансової підтримки науково-дослідних робіт студентів НТУУ "КПІ" на 2009/2011 н.р., і удостоєна Премії Національної академії наук України для молодих учених і студентів вищих навчальних закладів (постанова Президії НАН України від 16.02.2011 р.).

“АК “Київводоканал”), яку селекціонували протягом 2 місяців на модифікованому середовищі [7–9]: NH_4Cl – 0,31 г/л; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 2,452; Na_2HPO_4 – 4,576; KCl – 0,13; MgSO_4 – $3 \cdot 10^{-2}$; MnCl_2 – $0,5 \cdot 10^{-2}$; NaCl – $0,373 \cdot 10^{-2}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,1 \cdot 10^{-2}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – $0,1 \cdot 10^{-2}$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ – $0,077 \cdot 10^{-2}$; ZnSO_4 – $0,154 \cdot 10^{-2}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – $0,01 \cdot 10^{-2}$; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – $0,01 \cdot 10^{-2}$; H_3BO_3 – $0,01 \cdot 10^{-2}$; Na_2MoO_4 – $0,025 \cdot 10^{-2}$; NiCoNO_2 – $0,017 \cdot 10^{-2}$; $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – $0,025 \cdot 10^{-2}$; $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,334 г/л; вітаміни. Різниця потенціалів 180 ± 1 мВ між анодом і катодом забезпечувалась за допомогою перетворювача-випрямляча. Динаміку селекції електроактивних мікроорганізмів спостерігали за зміною сили струму. Процес відбувався за строго анаеробних умов (атмосфера аргону). Заміна субстрату здійснювалась періодично – 1 раз на 3 доби. Процес перебігав за сталої температури ($t = 30$ °C).

Система мікробного паливного елемента для дослідження процесу електрогенезу. Для конструювання анодної і катодної камер МПЕ було використано ємності з поліпропілену (маркування 05 PP, $0,90$ г/см³, стійкий до стирання, термостійкий, погано піддається мікробному розкладу). Об'єм анодної та катодної камер становить 820 мл для кожної. Геометричні розміри – $100 \times 80 \times 120$ мм. Кожна камера має кришку з поліпропілену, герметичність якої забезпечується резиновими прокладками. Відстань між центральними осями електродів – 175 мм. Відстань між найближчими крайніми точками електродів – 95 мм. Введення субстрату й інертного газу та вивід газів у анодній комірці здійснюється через шланги з полівінілхлориду (Ш-62-О, внутрішній діаметр $6 \pm 0,2$ мм), приєднані до отворів у кришці. Герметичність конструкції забезпечується кабельними вводами (сальники ввідні) PG-9. Анодом слугував відріз вуглецевої тканини (типу АУВМ “Днепр” ТУ У 88.023.026–96, масою 9,656 г, з геометричними розмірами 225×295 мм, корисна питома площа поверхні тканини – 1000 м²/г), з'єднаної з неізольованим мідним проводом. Катодом слугувала скловуглецева чаша марки СУ-2000

ТУ 1916-027-27208846-01. Анодна та катодна камери сполучені сольовим містком у шлангу з полівінілхлориду (марка Ш-62-О, внутрішній діаметр $8 \pm 0,25$ мм, довжина – 115 мм). Рецепт: 30 мл дистильованої води, 2,236 г калій хлориду (ч.д.а), 0,6 г бактоагару “Тур USA”.

Приріст іммобілізованої біомаси в міліграмах $\text{ХСК}_{\text{ом}}/\text{доби}$ обчислювався за модифікованою методикою визначення хімічного споживання кисню (ХСК) [10, 11] в умовах стаціонарної роботи мікробного паливного елемента. Для мікроскопічних досліджень клітини двічі відмивались стерильною водопровідною водою та осаджувались центрифугуванням при швидкості обертання $10\,000$ об/хв протягом 15 хв. Вони фіксувались у полум'ї пальника, і зразок забарвлювався за методом Грама [12]. Мікроскопічне дослідження проводилось за допомогою мікроскопа XSP-139TP під імерсією (кінцеве збільшення на мікрофотографіях – приблизно у 1000 разів). Електричні вимірювання напруги, сили струму та опору здійснювались за допомогою мультиметра марки M830 BU2. Для реалізації методів статистичної обробки використовувались програмні пакети MS Office Excel 2007, Mathcad 13, MATLAB R2008b.

Результати і їх обговорення

Основні показники ефективності процесу біоелектрогенезу можна умовно розділити на біотехнологічні, електрохімічні та інтегральні (рис. 1). До біотехнологічних показників ефективності отримання електричної енергії в лабораторній установці МПЕ варто віднести приріст біомаси (загальний і питомий), швидкість споживання субстрату (ефективність очищення), кулонівська продуктивність, баланс ХСК.



Рис. 1. Класифікація показників ефективності роботи МПЕ

субстрату (ефективність очищення, якщо використовуються стічні води або модель стічних вод), кулонівську продуктивність, баланс ХСК. Електрохімічними показниками, з допомогою яких можна описати базові характеристики МПЕ, є потенціали електродів (вимірюються відносно електродів порівняння), потужність, питома потужність, опір МПЕ та окремих частин системи, поляризаційні криві, криві потужності (потужність як функція від сили струму), загальна електрична (кулонівська) продуктивність і визначення напруги розімкненого кола холостого ходу. До інтегральних показників варто віднести такі показники, як енергетична ефективність (ККД), наявність медіаторів електронного переносу та нанопроводів [13]. Загалом показники для оцінки ефективності роботи МПЕ є спрощеними функціями залежностей окремих показників з тих, що використовуються при описі математичної моделі.

Розрахунок біотехнологічних показників ефективності біоелектрохімічного продукування електричної енергії. В рамках дослідження було розглянуто та проведено вимірювання біотехнологічних показників ефективності біоелектрогенезу.

Приріст біомаси – біотехнологічний показник, який дає змогу оцінити ступінь придатності умов роботи МПЕ для отримання максимальної кількості електричної енергії за оптимального росту бактерій.

Загальний приріст біомаси (X) – це кількість утвореної біомаси (в грамах ХСК) за визначений відрізок часу (годину, добу, період) – [г ХСК_{6м}/ добу].

Питомий приріст біомаси (Y) – це кількість утвореної біомаси (в грамах ХСК) за визначений відрізок часу (годину, добу, період) відносно кількості спожитого субстрату (в г ХСК) – [г ХСК_{6м}/ добу·г ХСК_{сб}]:

$$Y = \frac{X}{\Delta \text{ХСК}}. \quad (1)$$

Швидкість споживання субстрату – кількість спожитого мікроорганізмами субстрату (в грамах ХСК) за певний відрізок часу (годину, добу, період) – [г ХСК/ добу].

Кулонівська продуктивність (ε_K) – показник, який характеризує зміну кількості виробленого струму до зміни кількості окисненого (спожитого) субстрату:

$$\varepsilon_K = \frac{M \int_0^t Idt}{FbV_a \Delta \text{ХСК}}, \quad (2)$$

де $M=32$ – молекулярна маса кисню; F – стала Фарадея (96485 Кл/моль); $b=4$ – число перенесених електронів на моль кисню; V_a – об'єм рідини в анодній камері, $\Delta \text{ХСК}$ – зміна ХСК з часом t .

Баланс ХСК, необхідний для розрахунку частки субстрату, вилученого в ході супутніх невизначених хімічних чи біологічних процесів, визначається за формулою

$$\varphi = 1 - \varepsilon_K - Y. \quad (3)$$

Експериментальне визначення біотехнологічних показників ефективності безмедіаторного екзоелектрогенезу. У лабораторній установці, після проведеної селекції, за стаціонарних умов вивчено процеси, пов'язані з мікробіологічним продуцентом електричної енергії – асоціацією анаеробних мікроорганізмів – та здійснено оцінку процесу біотехнологічного отримання електричної енергії за рядом показників.

Максимальне значення приросту біомаси спостерігалось на другу добу культивування і становило 54,6% (8,55 мг ХСК_{6м}/добу або 13,68 мг ХСК_{6м}/добу в перерахунку на 1 м² анода) від загального (15,65 мг ХСК_{6м} або 25,04 г ХСК/м²) приросту за 5 діб (рис. 2, а). Подібний максимум можна пояснити тим, що протягом першої доби відбувається адаптація мікроорганізмів, потім (2–3-тя доба) – максимальний доступ до субстрату, а отже, найбільш інтенсивний ріст. На п'ятий день спостерігається найнижчий приріст біомаси, оскільки вичерпується доступний субстрат біля поверхні біоплівки і за відсутності масообміну та значного об'єму анодної камери він не надходить у достатній кількості. Середнє значення приросту становить 3,13 мг ХСК_{6м}/добу або 5 г ХСК_{6м}/добу в перерахунку на 1 м² анодної поверхні.

Розглядаючи динаміку швидкості споживання субстрату (рис. 2, б), варто зазначити, що найбільша інтенсивність споживання субстрату також припадає на 2-гу ($\Delta \text{ХСК} = 57$ мг О₂/л) і 3-тю добу ($\Delta \text{ХСК} = 36$ мг О₂/л), тоді як середня швидкість споживання субстрату за 4–5-ту добу становить лише 14,5 мг О₂/л. У таблиці наведено розрахункові значення питомого приросту біомаси.

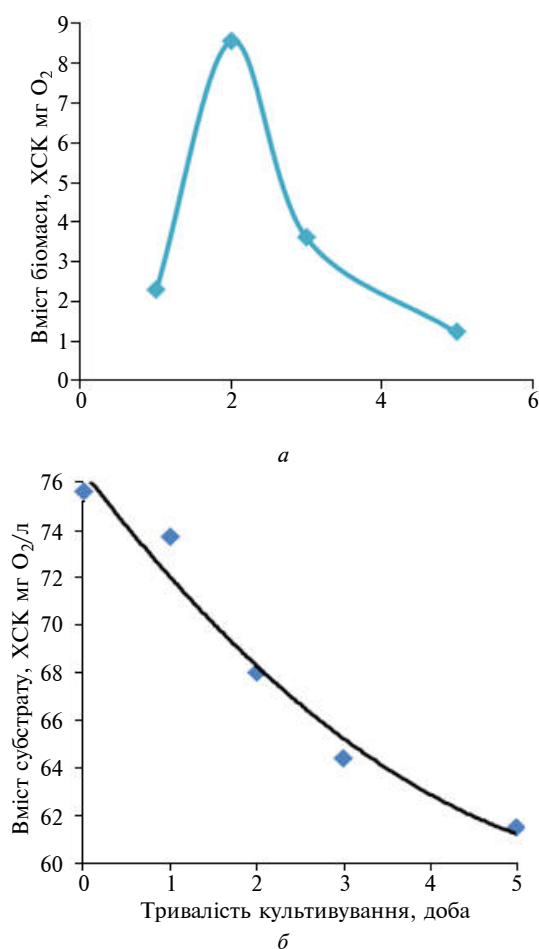


Рис. 2. Динаміка приросту біомаси на аноді (розмір вуглецевої тканини 25×25мм) (а) і швидкості споживання субстрату (б)

Таблиця. Зведена таблиця значень приросту біомаси (X), швидкості споживання субстрату ($\Delta X_{СК}$) і питомого приросту біомаси (Y) залежно від тривалості культивування (t)

t , доба	X , мг $X_{СК_{6M}}$ /добу	$\Delta X_{СК}$, мг $X_{СК_{6M}}$ /добу	Y , мг $X_{СК_{6M}}$ / мг $X_{СК_{суб}}$
1	2,28	19	0,12
2	8,55	57	0,15
3	3,6	36	0,1
5	1,218	14,5	0,084
Середнє значення	3,912	31,625	0,1135

Питомий приріст біомаси є не лише показником ефективності перетворення мікроорганізмами внесеного субстрату в електричну енергію, а й показником утворення надлишкової біомаси, оскільки в разі впровадження МПЕ в традиційні біологічні системи очищення стічних вод низька швидкість приросту надлишкової біомаси є перевагою. Для анаеробного процесу, а саме за біотехнологічного отримання електричної енергії в МПЕ, значення питомого приросту біомаси коливається в діапазоні 0,07–0,22 мг $X_{СК_{6M}}$ /мг $X_{СК_{суб}}$, тоді як приріст аеробної біомаси активного мулу при очищенні стічних вод в середньому становить 0,4 мг $X_{СК_{6M}}$ /мг $X_{СК_{суб}}$ [14].

Кулонівська продуктивність (ϵ_K) визначалась за формулою (2). Для її розрахунку за стаціонарної роботи МПЕ використовувались такі експериментальні і табличні значення: температура – 30 °С; вихідна концентрація субстрату (ацетату натрію) – 1 г/л ($X_{СК_0} = 756$ мг O_2 /л); кінцева концентрація – $X_{СК_t} = 615$ мг O_2 /л; період культивування $t = 5$ діб; $I_0 = 2$ мкА, $I_t = 164$ мкА; $M = 32$ – молекулярна маса кисню; F – стала Фарадея (96485 Кл/моль), $b = 4$ – число перенесених електронів на моль кисню, $V_a = 0,72$ л – об'єм рідини в анодній камері. З урахуванням таких даних кулонівська продуктивність становить $\epsilon_K = 0,132$.

Баланс ХСК розраховувався за формулою (3):

$$\varphi = 1 - \epsilon_K - Y = 1 - 0,132 - 0,1135 = 0,7545.$$

Отже, $\varphi = 0,7545$ – частка ХСК, що вилучена в ході хімічних чи біологічних процесів, не пов'язаних з отриманням електричної енергії та ростом іммобілізованої на електроді біоплівки.

Висновки

Запропонований підхід до класифікації методів дослідження безмедіаторного електрогенезу базується на особливостях процесу, який водночас є і біотехнологічним, і електрохімічним. Біотехнологічні показники дають змогу відобразити метаболічні процеси, що відбуваються в анодній камері МПЕ, з одного боку, та швидкість деструкції органічних речовин і продукування електричної енергії – з іншого. При цьому можливим є оцінювання частки процесів, направлених на продукцію електричної енергії.

Дані експериментальних досліджень показують, що більшість біологічних процесів в анодній

камері не пов'язані з продукуванням електричної енергії, а направлені на синтез суміші сполук, які є кінцевими акцепторами електронів для мікроорганізмів в асоціації. Отже, відсоток мікроорганізмів-екзоелектрогенів у виділеній асоціації є незначним, що свідчить про потребу вдосконалення процесу селекції та утворення біоплівки електроактивних мікроорганізмів. Також варто зменшити вміст розчинених речовин (за ХСК) та провести якісний і кількісний аналіз компонентів газової суміші, утворених в анодній камері, що дасть можливість визначити групи мікроорганізмів, які заважають процесу електрогенезу (наприклад, метаногени), та розробити способи пригнічення.

Експериментально підтверджено можливість біотехнологічного генерування електричної енергії з використанням асоціації анаеробних мікроорганізмів у лабораторній установці безмедіаторного мікробного паливного елемента. Стаціонарна робота цієї установки буде ефек-

тивна за таких біотехнологічних показників: питомий приріст біомаси $Y = 0,1135$ мг ХСК_{бм}/мг ХСК_{суб}; кулонівська продуктивність $\epsilon_K = 0,132$; частка ХСК, вилучена в ході хімічних чи біологічних процесів, не пов'язаних з отриманням електричної енергії та ростом іммобілізованої на електроді біоплівки, $\phi = 0,7545$.

У разі успішних розробок та впровадження технологія безмедіаторного електрогенезу може зайняти свою нішу в відновлюваній енергетиці майбутнього та в інженерних системах захисту і збереження навколишнього природного середовища.

У подальших дослідженнях планується здійснити конструктивні та технологічні вдосконалення мікробного паливного елемента, вивчити вплив складу субстрату на процес екзоелектрогенезу і визначити точки оптимізації для впровадження на очисних спорудах підприємств легкої та харчової промисловості.

1. Кузьмінський Є.В., Шурська К.О. Біоелектрохімія – невід'ємна складова нового технологічного укладу // Науковий вісник Чернівецького ун-ту. – 2010. – Вип. 526. – С. 9–20.
2. Gorby Y. A., Yanina S., McLean J.S. et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms // PNAS. – 2006. – P. 46–58.
3. Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T. et al. Extracellular electron transfer via microbial nanowires // Nature. – 2005. – 435. – P. 1098–1101.
4. El-Naggar M.Y., Gorby Y.A., Xia W., Nealon K.H. The molecular density of states in bacterial nanowires // Biophys. J. – 2008. – N 95. – P. 10–12.
5. Logan B.E., Regan J.M. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells // Trends Microbiol. – 2006. – N 14. – P. 512–518.
6. Gorby Y.A., Beveridge T.J. Composition, reactivity, and regulation of extracellular metal-reducing structures (nanowires) produced by dissimilatory metal reducing bacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – 68. – P. 1120–1134.
7. Шурська К.О., Самаруха І.А. Двоступенева селекція анодної біоплівки в мікробному паливному елементі // Екологія. Людина. Суспільство: Тез. доп. учасників наук.-практ. конф., Київ, 19–23 травня 2008 р. – К.: ЕКМО, 2010. – С. 343–344.
8. Wang A., Sun D., Ren N. et al. A rapid selection strategy for an anodophilic consortium for microbial fuel cells // Bioresour Technol. – 2010 Jul;101(14):5733-5. Epub 2010 Mar 9.
9. Liu Y., Harnisch F., Fricke K. et al. Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure // Biosensors & Bioelectronics. – 2008. – N 24. – P. 1006–1011.
10. НД 211.1.4.020-95. Методика визначення хімічного споживання кисню (ХСК) в природних і стічних водах. – К., 1995.
11. Bullock C.M., Bicho P.A., Zhang Y., Saddler J.N. A solid chemical oxygen demand (COD) method for determining biomass in waste waters // Water Research. – 1996. – 30, Is. 5. – P. 1280–1284.
12. Bergey D.H., Holt, J.G., Krieg N.R., Sneath A. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. – 9th ed. – Washington: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. – 365 p.
13. Самаруха І.А., Шурська К.О. Методи дослідження електрохімічно активних бактерій як біологічного компоненту безмедіаторних мікробних паливних елементів // Екологія. Людина. Суспільство: Тез. доп. учасників наук.-практ. конф., Київ, 19–23 травня 2008 р. – К.: ЕКМО, 2010. – С. 338–339.
14. Logan B.E., Hamelers B., Rozendal R. et al. Microbial fuel cells: Methodology and technology // Environmental Science and Technology. – 2006. – 40, N 17. – P. 5181–5192.