

УДК 66.098:546.11

К.О. Щурська, Л.С. Зубченко, Є.В. Кузьмінський

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ЕКЗОЕЛЕКТРОГЕНІВ
НА БІОЕЛЕКТРОХІМІЧНИЙ ПРОЦЕС ВИДІЛЕННЯ ВОДНЮ**

This paper presents a brief overview of methods for obtaining hydrogen. We study the influence of cultivation conditions of exoelectrogenes on the efficiency of bioelectrochemical hydrogen production. We describe the method of two-stage anode biofilm selection, which is used for exoelectrogenes immobilization on the anode. Furthermore, we determine the impact of the applied voltage values ranged from 0,2 to 0,8 V on the process of bioelectrochemical hydrogen production using sodium acetate as a substrate. We utilize glucose, citric acid and sodium acetate to investigate the influence of substrate on bioelectrochemical hydrogen production process. By employing sodium acetate in the concentration range from $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ to $35 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, we determine the optimal concentration of carbon-containing substrate in the nutrient medium. We describe the systems and methods of conducting the experiment used to study the influence of exoelectrogenes cultivation conditions on the process of bioelectrochemical hydrogen evolution. Finally, we define the basic indicators used to evaluate the effectiveness of bioelectrochemical system.

Вступ

На сьогодні більшу частину водню, який використовують у світі, отримують із невідновлюваних джерел енергії: з природного газу (50 %), продуктів нафтопереробки (30 %), вугілля (18 %) або електролізом із використанням електроенергії, яку також отримано переважно з невідновлюваних джерел енергії (2 %). Незважаючи на те, що деякі з методів отримання водню мають доволі високу ефективність (наприклад, електроліз води), вони потребують значних витрат, що робить їх малопридатними для широкомасштабного застосування. Інші методи (газифікація вугілля або конверсія природного газу) призводять до вивільнення вуглекислого газу в атмосферу. Тому в наш час найбільш перспективними є біотехнологічні методи отримання водню, адже сировиною для таких процесів можуть бути такі відновлювані джерела як біомаса, тверді відходи, а також різноманітні стічні води, які багаті органічними сполуками [1].

У вирішенні цієї проблеми застосування біоелектрохімічних систем (БЕХС) є дуже перспективним, адже з їх допомогою можна не лише отримувати водень високої чистоти, а й очищати стічні води різноманітного походження, які в цьому випадку можуть бути сировиною для цього процесу [2].

Порівняно з іншими процесами біологічного виділення водню біоелектрохімічне отримання водню має ряд важливих переваг [2]. У низці праць було показано, що аноди з іммобілізованими екзоелектрогенами можуть ефективно працювати за нестерильних умов, так як таке угруповання селекціонується природним шляхом із широкого кола мікроорганізмів і

здатне до утилізації різноманітних субстратів (у т.ч. цукрів, жирних кислот і білків) з високою ефективністю [3–5]. Інші біологічні процеси синтезу водню часто зазнають негативного впливу від сторонньої біоти при нестерильних умовах і є більш обмеженими у доступних субстратах, які вони здатні утилізувати. Крім того, в процесі біоелектрохімічного отримання водню в катодній камері утворюється практично чистий водень, на відміну від суміші водню та вуглекислого газу при бродінні. Таким чином, біоелектрохімічний процес може бути не лише наступним етапом після бродіння, а й повністю замінити його в певних випадках (наприклад, при очищенні стічних вод) [1].

Постановка задачі

Метою роботи є дослідження впливу на ефективність біоелектрохімічного продукування водню таких умов культивування екзоелектрогенів, як значення прикладеної напруги, склад і концентрація вуглецевмісного субстрату в поживному середовищі.

Матеріали та методи

Біоелектрохімічна система. Для дослідження процесу біоелектрохімічного продукування водню було вибрано двокамерну БЕХС, яка складалася із анаеробних анодної та катодної камер, розділених протонпроникною мембраною. Об'єм як анодної, так і катодної камер становив 800 см³. Введення поживного середовища й інертного газу аргону (для забезпечення анаеробних умов) та виведення газів з анодної камери здійснювалося через шланги з полівінілхлориду.

Як анод використано вуглецеву тканину АУВМ “Дніпро” ТУ У 88.023.026-96 з геометричними розмірами 225 на 295 мм. На аноді було селекціоновано біоплівку екзоелектрогенних (здатних до позаклітинного перенесення електронів) мікроорганізмів. Катодом слугував стандартний платиновий електрод. Як протон-проникна мембрана використовувався сольовий місток, що готувався з водного розчину одномолярного хлориду калію з додаванням бактеріального агару “Тур USA” (FERAK BERLIN (Берлін, Німеччина, ЄС)).

Для накладення напруги постійного струму на електроди було використано спеціально сконструйоване джерело живлення, яке давало можливість змінювати різницю потенціалів між анодом і катодом від 0,2 до 1,0 В.

В анодній камері проводили селекцію та культивування екзоелектрогенів у поживному середовищі, яке містило, г/дм³: NH₄Cl – 0,31; NaH₂PO₄·H₂O – 2,452; Na₂HPO₄ – 4,576; KCl – 0,13; MgSO₄ – 3·10⁻²; MnCl₂ – 0,5·10⁻²; NaCl – 0,373·10⁻²; FeSO₄·7H₂O – 0,1·10⁻²; CaCl₂·2H₂O – 0,1·10⁻²; Co(NO₃)₂ – 0,077·10⁻²; ZnSO₄ – 0,154·10⁻²; CuSO₄·5H₂O – 0,01·10⁻²; AlK(SO₄)₂ × 12H₂O – 0,01·10⁻²; H₃BO₃ – 0,01·10⁻²; Na₂MoO₄ – 0,025·10⁻²; NiCoNO₂ – 0,017·10⁻²; NaWO₄·2H₂O – 0,025·10⁻²; CH₃COONa·3H₂O – 0,334; вітаміни. Катодна камера наповнювалася фосфатним буферним розчином з рН 7.

Селекція електроактивних бактерій на аноді БЕХС. У цій роботі було застосовано двоступеневу селекцію анодної біоплівки, що дало змогу істотно скоротити час її формування. Першою стадією був засів біомаси активного мулу (триразове внесення біологічного матеріалу), другою – збагачення утвореної біоплівки. Для селекції електроактивних мікроорганізмів вносили анаеробний активний мул з Бортницької станції аерації (БАТ “АК “Київводоканал”) – тричі по 350 см³ з інтервалом 7–14 діб.

Середовище для росту бактерій містило такі компоненти: NH₄Cl (0,31 г/дм³), KCl (0,13 г/дм³), NaH₂PO₄·H₂O (2,69 г/дм³), Na₂HPO₄ (4,33 г/дм³), а також розчин вітамінів і мінералів. Як вуглецевмісний компонент поживного середовища було використано ацетат натрію (10·10⁻³ моль/дм³). Перед інокуляцією розчин субстрату продувався аргоном для видалення кисню. Культивування проводилося при температурі 30 °С.

Для формування первинної біоплівки 350 см³ суспензії активного мулу вносили у герметичну камеру, в якій містилось 400 см³ розчину поживного середовища та буфера. Для забезпечення ефективного формування біоплівки до електродів була прикладена додаткова напруга у 0,22 В. Ріст біоплівки контролювався шляхом вимірювання сили струму, що виникає внаслідок біоелектрокаталітичного окиснення субстрату. Для формування вторинної біоплівки утворену первинну біоплівку культивували за таких самих умов, але без додавання нових порцій активного мулу, тобто лише з регулярним додаванням поживних речовин у реакційне середовище.

Дослідження анодної поверхні проводилося за допомогою мікроскопії. Мікроскопіювалися зразки екзоелектрогенів, вилучених із поверхні анода (вуглецевої тканини) разом із волокнами самої вуглецевої тканини. Це дослідження здійснено за допомогою мікроскопа XSP-139TP під імерсією при збільшенні ×1000. Для вивчення складу біоплівки було використано мікроскопіювання мікроорганізмів анодної біоплівки, пофарбованої за Грамом [6].

Методика експерименту. При дослідженні впливу значення доданої напруги на процес виділення водню в катодну камеру додавався буферний розчин, а в анодну – розчинений у буфері ацетат натрію в концентрації 1 г/дм³, розчин мінералів і вітамінів. Значення доданої напруги варіювалося в діапазоні від 0,2 до 0,8 В. Об'єм виділеного газу вимірювався волюмометрично.

Для дослідження впливу складу та концентрації вуглецевмісного субстрату в поживному середовищі вибрано глюкозу, ацетат і лимонну кислоту.

Культивування екзоелектрогенів проводилося у періодичному режимі; після додавання свіжого поживного середовища камера продувалася інертним газом (аргоном). Визначення хімічного споживання кисню (ХСК) виконувалося за стандартною методикою [7].

Оцінка показників ефективності біоелектрохімічного продукування водню. Розрахунок виходу водню та показників ефективності його продукування було проведено на основі значень видалення ХСК з розчину в процесі культивування за відповідними формулами [8].

Ефективність роботи БЕХС оцінюють за такими показниками, як катодна рекомбінація водню та кулонівська ефективність.

Загальна теоретична кількість молів водню, яка може бути виділена на основі виділеної органіки за показником ХСК, розраховується за формулою

$$v_{th} = \frac{b_{H_2/S} \cdot v_L \cdot \Delta XСК}{M_S},$$

де $b_{H_2/S}$ – максимально можливий стехіометричний вихід водню з молю субстрату, моль/моль; $\Delta XСК$ – різниця значень ХСК на початку культивування та в кінці, мг $O_2/дм^3$; M_S – молекулярна маса субстрату, г/моль.

Кількість молей рекомбінованого водню на основі виміряного струму розраховується на основі такого рівняння:

$$v_{CE} = \frac{\int_{t=0}^t I dt}{2F},$$

де $I = V/R_{ex}$ – сила струму, розрахована зі значення напруги, прикладеної до резистора з опором (10 Ом), А; $F = 96\,485$ – стала Фарадея, Кл/моль; dt – проміжки часу, через які здійснювався замір даних, с.

Кулонівська ефективність (C_E) розраховується за рівнянням

$$C_E = \frac{v_{CE}}{v_{th}}.$$

Відношення кількості молей виділеного водню до можливої кількості молей, яка може бути отримана на основі виміряного струму, є показником катодної рекомбінації водню ($r_{кат}$) і розраховується таким чином:

$$r_{кат} = \frac{v_{H_2}}{v_{CE}},$$

де v_{H_2} – кількість молей водню, виділеного протягом періодичного культивування, моль.

Загальна продуктивність водню (R_{H_2}) розраховується за рівнянням:

$$R_{H_2} = r_{кат} \cdot C_E.$$

Результати та їх обговорення

Аналіз біоплівки. На початку досліджень було мікроскопійовано зразок вихідної вуглецевої тканини без екзоелектрогенів. Після двотижневої процедури іммобілізації екзоелектрогенів і формування анодної біоплівки за результатами мікроскопійовання можна зробити висновок про її

успішне заселення мікроорганізмами-екзоелектрогенами. Як і очікувалося, більшість мікроорганізмів анодної біоплівки виявилися грамнегативними і лише деякі ланцюжки паличок грам-позитивні. Якщо порівнювати отримані результати з літературними даними щодо електрохімічно активних мікроорганізмів, то найбільш імовірно, що грам-позитивними паличками є саме *Clostridium butyricum*, які були описані як найпоширеніші грам-позитивні електрогени [9].

Ця методика з визначення груп мікроорганізмів анодної біоплівки є простою і наочною, проте, недостатньою для всебічного аналізу представників біоплівки. Більш детальний аналіз потребує досліджень ДНК-послідовностей мікроорганізмів для встановлення, до яких саме родів вони належать, але в цій роботі не було поставлено такого завдання.

Вплив значення прикладеної напруги на біоелектрохімічне продукування водню. При визначенні впливу прикладеної напруги на процес виділення водню в БЕХС як основний компонент поживного середовища було вибрано ацетат натрію. Такий вибір зумовлений тим фактом, що ацетат є кінцевим продуктом бродіння водень-продукуючих бактерій і тому отриманий водень можна впевнено вважати виділеним у біоелектрохімічному процесі, а не при бродінні. З іншого боку, після отримання водню звичайним бродінням із глюкози чи целюлози середовище містить велику кількість ацетату, тому БЕХС, що працюють на ацетаті, можна використовувати для доочищення стоків після бродіння.

Залежність таких показників, як об'єм виділеного водню та час, за який відбувається інтенсивне виділення газу, від значення прикладеної напруги наведено на рис. 1.

З рис. 1 видно, що об'єм виділеного водню зростає зі збільшенням прикладеної напруги – при підвищенні напруги від 0,2 до 0,8 В об'єм виділеного водню збільшується в 20 разів. При цьому час культивування зменшується від 84 до 57 год. Для встановлення оптимального значення прикладеної напруги, при якому відбуватиметься максимальне виділення водню, доцільно будувати графіки залежності таких показників ефективності, як кулонівська ефективність, катодна рекомбінація водню та загальна рекомбінація водню. На рис. 2 подано залежності показників ефективності від прикладеної напруги.

З наведених графіків однозначно впливає, що зі збільшенням прикладеної напруги всі показники ефективності зростають лише до зна-

чення 0,6 В, після чого відбувається спад усіх трьох показників. З отриманих даних можна зробити висновок, що найбільш ефективним є використання значення напруги у 0,6 В, адже при

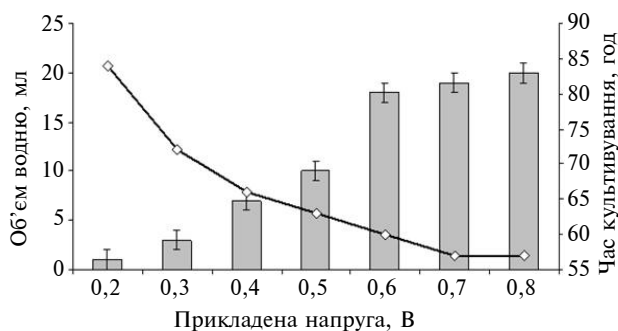


Рис. 1. Залежність об'єму виділеного водню та часу культивування, за який відбувається інтенсивне газоутворення, від прикладеної напруги: \square – об'єм водню, мл; \diamond – час культивування, год

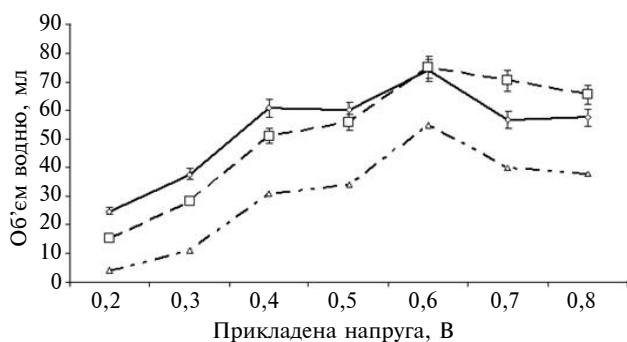


Рис. 2. Залежність показників кулонівської ефективності, катодної та загальної рекомбінацій водню від значень прикладеної напруги: \circ – кулонівська ефективність, %; \square – катодна рекомбінація водню, %; \triangle – загальна рекомбінація водню, %

цьому зберігаються всі максимальні показники ефективності процесу продукування водню.

Вплив складу субстрату на процес біоелектрохімічного виділення водню в БЕХС. Склад поживного середовища для екзоелектрогенів є одним із найважливіших параметрів, що впливає на вихід водню в БЕХС. Для дослідження впливу цього фактора на процес біоелектрохімічного продукування водню було використано глюкозу, лимонну кислоту й ацетат натрію. Вибір саме цих сполук пояснюється таким чином. Глюкоза є базовим субстратом для дослідження продукування водню не лише в процесі електрогенезу в БЕХС, а й при бродінні. Також для порівняння виходу водню з різних субстратів цей показник перераховують на глюкозу. Щодо ацетату натрію, то ця сполука – побічний продукт процесів продукування водню бродінням, тому також є сировиною для утилізації. Лимонна кислота –

поширена і доступна органічна кислота, тому на її прикладі можна довести можливість продукування водню з органічних кислот.

Найбільшу кількість водню було отримано при культивуванні екзоелектрогенів з глюкозою – 90 см³ водню. Менші його об'єми отримано при використанні лимонної кислоти (28 см³) та ацетату (18 см³). Для визначення ефективності того або іншого субстрату необхідно порівняти теоретично можливий вихід для конкретного виду субстрату з експериментально отриманим. Для цього на рис. 3 білим кольором показано теоретично можливий вихід водню, а сірим – рівень, який було досягнуто в експерименті. Для кількісної оцінки застосовують такий показник, як загальне відновлення водню у відсотках.

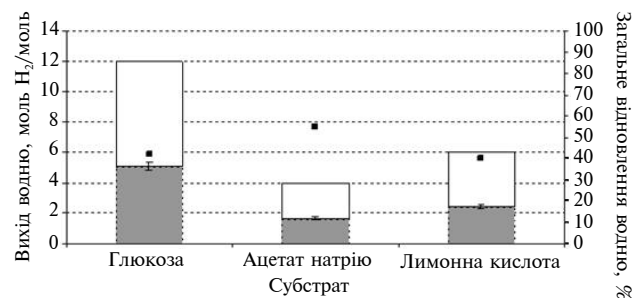


Рис. 3. Залежність теоретичного та практичного виходу водню (моль H₂/моль) і загального відновлення водню від субстрату: \square – практичне значення; \square – теоретичне значення; \blacksquare – загальне відновлення водню, %

З рис. 3 випливає, що максимально можливих (теоретичних) показників не було досягнуто із жодного з розглянутих у роботі субстратів, а максимальне продукування водню отримано у випадку використання ацетату натрію (55%). Високий показник загального продукування водню для ацетату натрію можна пояснити тим, що він є простішим за своїм складом і специфічним саме для екзоелектрогенів, на відміну від глюкози і лимонної кислоти, які за рахунок власної універсальності можуть використовуватися не тільки екзоелектрогенами, а й іншими представниками анодного консорціуму, метаболізм яких не направлений на продукування протонів водню та електронів. Наведене свідчить про те, що водень у БЕХС може вироблятися з різноманітних органічних сполук.

Вплив концентрації субстрату на біоелектрохімічне продукування водню в БЕХС. Серед базових параметрів, що впливають на процес біоелектрохімічного отримання водню, важливе значення також має оптимальна концентрація органічних речовин, які виступають у ролі субстрату для еле-

ктрохімічно активних мікроорганізмів анодної біоплівки. Отримані результати наведено на рис. 4.

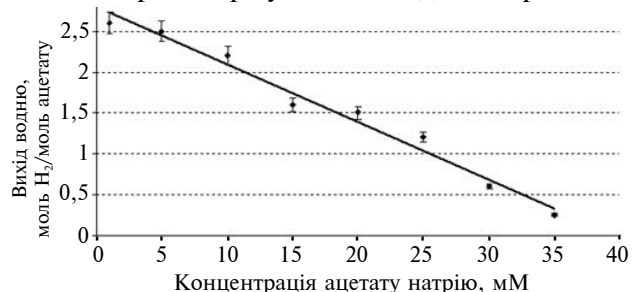


Рис. 4. Залежність виходу водню від концентрації ацетату натрію

З рис. 4 видно, що зі зростанням концентрації зменшується значення виходу водню з однієї молекули ацетату. Таку залежність можна пояснити міжйонними взаємодіями у розчині електролітів. З іншого боку, високі концентрації іонів збільшують іонну силу розчинів, що може призвести до лізису та загибелі клітин [10]. Тому, з огляду на отримані експериментальні дані та теоретичне обґрунтування, вважаємо концентрації ацетату натрію у діапазоні від $1 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ найоптимальнішими для продукування водню в БЕХС.

Висновки

На основі виконаного дослідження доведено, що в процесі двоступеневої селекції ек-

зоелектрогенів відбувається ефективне утворення анодної біоплівки, яку формують в основному грамнегативні бактерії.

У результаті вивчення впливу умов культивування екзоелектрогенів встановлено, що оптимальне продукування водню відбувається за прикладеної напруги у 0,6 В. При цьому досягаються найвищі показники кулонівської ефективності, катодної та загальної рекомбінацій водню. При дослідженні впливу джерел вуглецю встановлено, що за використання жодної з розглянутих у статті сполук не було отримано максимально можливих показників, а серед представлених субстратів максимального значення продукування водню досягнуто у випадку використання ацетату натрію.

У ході вивчення впливу концентрації ацетату натрію на ефективність виділення водню встановлено, що при зростанні концентрації зменшується значення виходу водню з однієї молекули ацетату; найефективнішими для продукування водню в БЕХС є концентрації ацетату натрію у діапазоні від $1 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³.

При проведенні подальших досліджень необхідно дослідити процес продукування водню з використанням стічних вод як субстрату для екзоелектрогенів; удосконалити конструкцію реактора для забезпечення ефективного масообміну в середовищі.

1. Шурська К.О., Кузьмінський Є.В. Способи продукування біоводню // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2011. – № 3. – С. 105–114.
2. Кузьмінський Є.В., Шурська К.О. Біоелектрохімічне генерування водню в мікробному паливному елементі. Загальна частина // Відновлювальна енергетика. – 2010. – № 4 (23). – С. 87–97.
3. K. Rabaey, W. Ossieur, M. Verhaege, W. Verstraete, "Continuous Microbial Fuel Cells Convert Carbohydrates to Electricity", *Water Sci. and Technol.*, no. 52, pp. 515–523, 2005.
4. J. Heilmann, B.E. Logan, "Production of Electricity from Proteins Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell", *Water Environment Research*, no. 78, pp. 531–537, 2006.
5. K. Rabaey, G. Lissens, S.D. Siciliano, W. Verstraete, "A Microbial Fuel Cell Capable of Converting Glucose to Electricity at High Rate and Efficiency", *Biotechnol. Letters*, no. 25, pp. 1531–1535, 2003.
6. D.H. Bergey, J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. – 788 p.
7. Методика визначення хімічного споживання кисню (ХСК) в природних і стічних водах: КНД 211.1.4.020-95. – К., 1995. – 16 с.
8. B.E. Logan, D. Call, S. Cheng et al. "Microbial Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter", *Environmental. Sci. and Technol.*, no. 42(23), pp. 8630–8640, 2008.
9. B.H. Kim, H.J. Kim, M.S. Hyun, D.H. Park, "Direct Electrode Reaction of Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella putrefaciens*", *J. of Microbiol. and Biotechnol.*, no. 9, pp. 127–131, 1999.
10. Кузьмінський Є.В., Голуб Н.Б. Біофізика. – К.: ВД "Комп'ютерпрес", 2007. – 424 с.