

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.6:574.24

ГЕНЕРАЦИЯ РАЗНОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ НА ЭЛЕКТРОДАХ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА ПРИ АНАЭРОБНОМ ОКИСЛЕНИИ СУБСТРАТОВ АССОЦИАЦИЯМИ МИКРООРГАНИЗМОВ**Е.Л. Барский, Г.А. Дольникова, Я.В. Саванина, Е.С. Лобакова***(кафедра биоинженерии; e-mail: gene_b@mail.ru)*

Из природных и антропогенного источников выделено несколько микробных ассоциаций, хорошо растущих на глюкозе и значительно хуже на ацетате. За 3—5 сут роста на глюкозе культуры ассоциаций потребляют до 80—95% субстрата окисления и генерируют разность электрических потенциалов (РЭП) между анодным и катодным электродами микробного топливного элемента (МТЭ). Величина РЭП зависит от природы ассоциации и субстрата и достигает 400—500 мВ. Генерация РЭП сопровождается сдвигом в отрицательную область окислительно-восстановительного потенциала (E_h) среды до $-(400—500)$ мВ. Это указывает на выделение H_2 при окислении углеводов культурами ассоциаций. Искусственные редокс-медиаторы, такие как тетраметил-п-фенилендиамин, феназинметосульфат и бензилвиологен способствуют увеличению до 15% РЭП на электродах МТЭ. Предполагается, что увеличение РЭП, индуцированное редокс-медиаторами, обусловлено их непосредственным участием в переносе электронов от бактерий в среде инкубации на анодный электрод МТЭ. Прямое измерение тока и разности потенциалов на электродах в режиме “короткого замыкания” показывает, что внутреннее сопротивление МТЭ составляет приблизительно 1 Ком, а мощность достигает 5 мкВт.

Ключевые слова: ассоциации микроорганизмов, рост на глюкозе и ацетате, микробный топливный элемент, генерация разности электрических потенциалов.

Поиск альтернативных возобновляемых источников энергии привел к открытию способности микроорганизмов генерировать электрический ток при анаэробном окислении органических субстратов в устройствах, названных микробиологическими топливными элементами (МТЭ). В этих устройствах микроорганизмы и субстраты окисления находятся в анаэробных условиях в анодной камере, а катодная камера, напротив, — в аэробных условиях. Обе камеры разделены ионоселективной мембраной, пропускающей протоны. Микроорганизмы сбрасывают электроны на анод, и далее через электрическую цепь электроны переносятся к катоду [1].

Из различных природных и антропогенных источников выделены сообщества анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов для работы МТЭ [2—4]. Эти ассоциации содержат “электрогенные” микроорганизмы из различных семейств: *Geobacteraceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Clostridiaceae*, *Aeromonadaceae*, *Alteromonadaceae* [1], а также *Proteobacteria*, *Acidobacteria* [5]. В качестве субстратов окисления для “электрогенных” бактерий могут использоваться спирты, органические кислоты, сахара.

Величина электрического тока в МТЭ зависит от природы субстрата окисления. Различные значения

электрического тока получены при использовании бутирата, пропионата, ацетата и этанола [6]. Перенос электронов на анод может происходить при прямом физическом контакте “электрогенных” бактерий с материалом электрода. Так, клетки бактерии *Geobacter* sp., взаимодействуя с электродом, используют периплазматические цитохромы типа *c* как металлредуктазу. Эти бактерии располагаются на поверхности анода и используют имеющиеся у них пилы для передачи электронов на электрод [1].

“Электрогенные” бактерии могут также взаимодействовать с анодом через редокс-медиаторы, такие как тионин, метилвиологен, гуминовые кислоты, нейтральный красный и др. [7]. *Escherichia coli* и *Proteus vulgaris* могут генерировать электрический ток в МТЭ при использовании в качестве редокс-медиаторов тионин или 2-окси-1,4-нафтохинон. Клетки цианобактерии *Anabaena variabilis* на свету также могут поставлять электроны на анод через 2-окси-1,4-нафтохинон, а клетки *Desulfovibrio desulfuricans* — через виологеновые красители [8]. Наличие в МТЭ сопутствующей микрофлоры наряду с “электрогенными” бактериями оказывает влияние на величину электрического тока в МТЭ [1]. Ток, генерируемый клетками *Brevi-*

bacillus, зависит от наличия в среде молекул феназина, выделяемого клетками *Pseudomonas*. Это соединение обладает свойствами редокс-медиатора, т.е. способствует переносу электронов от “электрогенных” бактерий к анодному электроду [9].

Объекты и методы

В качестве объектов исследования использовали природные ассоциации микроорганизмов, выделенные из образцов почвы и ила:

- 1) торф из верхового болота Тверской обл. (ТА);
- 2) ил отстойника металлургического предприятия Тулачермет (ТИО);
- 3) лечебный ил оз. Большой Тамбукан (Ставропольский край), обогащенный гетеротрофными бактериями *Pseudomonas* sp. (ИОМ);
- 4) илистые отложения прибрежной зоны Белого моря (БА).

Накопительные культуры ассоциаций получали, как описано ранее [10]. Содержание углеводов в среде культивирования ассоциаций, выращенных на качалке, определяли с антроновым реактивом [11] фотометрически в диапазоне 620–670 нм. Величину рН и окислительно-восстановительного потенциала (E_h) среды культивирования измеряли электрометром фирмы “Cole-Parmer” (США). Для определения рН использовали комбинированный стеклянный электрод; E_h среды измеряли Pt-электродом с Ag/AgCl-электродом сравнения (все электроды российского производства).

Микробные ассоциации культивировали также в 2,5-литровых камерах МТЭ, предоставленных В.В. Федоровичем. Камера содержала в одной из боковых стенок катодный электрод, отделенный от объема камеры ион-селективной мембраной. Анодный электрод представлял собой синтетическую ткань, площадью около 80 см², пропитанную активированным углем и соединенную с угольным стержнем. Электрод находится в объеме камеры, а стержень — с наружной стороны крышки. В крышку также вставлены платиновый электрод и Ag/AgCl-электрод сравнения, относительно которого измеряется E_h среды. Цифровым вольтметром регистрировали РЭП между анодным и катодным электродами.

В камеру помещали 25 мл концентрированной суспензии исследуемой ассоциации микроорганизмов и затем ее заполняли средой, содержащей 0,15 М K₂HPO₄ (рН 5,2–5,3) и в качестве субстрата окисления глюкозу или ацетат в концентрации 15 и 3 г/л соответственно. Культивирование проводили в течение 6–7 сут при комнатной температуре при перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 90 об/мин. Биомасса культуры нарастает в объеме камеры, в виде хлопьев на дне камеры и на поверхности ткани анодного электрода.

Результаты и их обсуждение

Ранее показано [10], что культуры микробных ассоциаций ТА, ТИО, ИОМ эффективно окисляют углеводы спиртовой барды с образованием летучих жирных кислот, главным образом ацетата. Эти культуры, а также культура ассоциации БА, растут на среде с глюкозой в камере МТЭ и генерируют на ее электродах разность электрических потенциалов.

Как видно из рис. 1, РЭП между анодным и катодным электродами МТЭ с минусом на аноде быстро нарастает и достигает через 50–100 мин инкубации культуры ТА (при переходе на стационарный уровень) максимальных значений в районе –400 мВ. Сходным образом увеличивается E_h среды, достигая максимальных значений около –300 мВ.

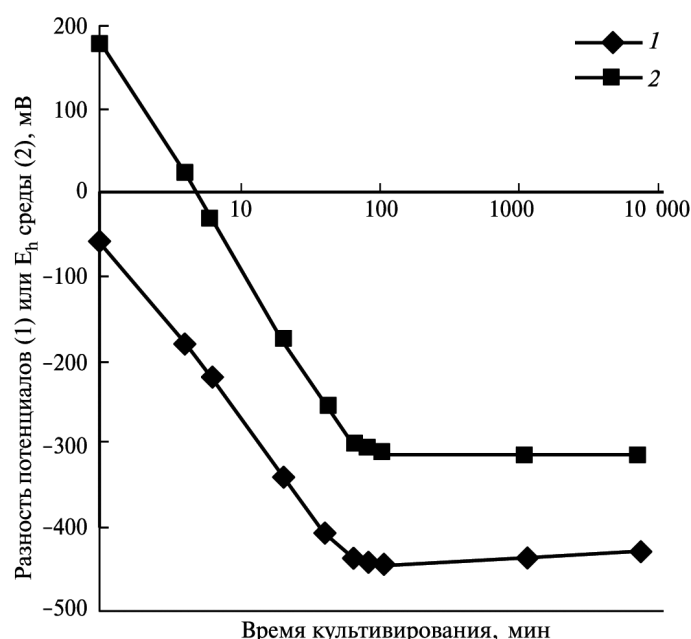


Рис. 1. Изменения РЭП между анодом и катодом МТЭ (1) и E_h среды (2) в динамике развития культуры ТА на среде с глюкозой

В таблице представлены данные по стационарным значениям РЭП и величине E_h среды для исследуемых культур ассоциаций, инкубируемых с глюкозой или ацетатом в качестве субстрата окисления. РЭП и величина E_h среды для культур ассоциаций ТА, ИОМ и ТИО на среде с глюкозой достигают высоких значений, тогда как для ассоциации БА величины этих параметров значительно ниже. Существенно отличаются значения РЭП и E_h среды для культур ассоциаций, инкубируемых с ацетатом. С одной стороны, разность потенциалов в 1,5–2 раза ниже по сравнению с таковой на среде с глюкозой, а с другой — величина редокс-потенциала среды не только кардинально сокращается по абсолютному значению в процессе инкубации культур с ацетатом (за исключением культуры ТА), но переходит в область положительных значений (таблица).

Величина разности потенциалов между анодом и катодом МТЭ, а также E_h среды при достижении стационарного состояния

№ п/п	Наименование ассоциации	Разность потенциалов, мВ	E_h среды, мВ
Инкубация с глюкозой			
1	ТА	-475	-380
2	ИОМ	-440	-360
3	ТИО	-455	-400
4	БА	-241	-330
Инкубация с ацетатом			
1	ТА	-222	-70
2	ИОМ	-180	186
3	ТИО	-362	65
4	БА	-151	152

Такой характер зависимости РЭП и E_h среды от природы субстрата окисления, вероятно, обусловлен наличием в составе ассоциаций первичных анаэробов, которые при окислении глюкозы наряду с органическими кислотами (в основном ацетат) образуют CO_2 и при участии гидрогеназы — H_2 [1], а выделенные субстраты окисляются вторичными анаэробами [12]. Образование H_2 должно приводить к значительному сдвигу редокс-потенциала среды в область отрицательных значений, поскольку величина E_h для среды, насыщенной молекулярным водородом, составляет около -800 мВ. При окислении ацетата, “бедного” в энергетическом смысле субстрата, образуется только CO_2 , а количество переданных на анод электронов, по-видимому, существенно ниже, чем при окислении глюкозы.

По величине рН культуры ассоциаций как на среде с глюкозой, так и с ацетатом практически не различаются (данные не представлены), но значительно отличаются по скорости и характеру окисления глюкозы (рис. 2). Относительно слабой активностью обладают культуры ИОМ и БА, а наибольшую активность проявляют культуры ТА и ТИО. Эти данные коррелируют с изменениями разности потенциалов и E_h среды для культур, инкубируемых на среде с глюкозой (таблица). Следует отметить, что модифицированная нами микробная ассоциация ТИО, сформированная из описанной ранее ассоциации “Тамбуканский ил” [10] и культуры грамположительной бактерии *Pseudomonas* sp., выделенной из ила отстойника металлургического предприятия “Тулачермет” и устойчивой к токсическому действию ряда тяжелых металлов [13, 14], оказалась наиболее эффективной как в отношении окисления глюкозы, так и в отношении снижения E_h среды.

“Электрогенные” бактерии, и, вероятно, не только они, могут взаимодействовать с анодным электродом через промежуточные окислительно-восстановительные переносчики электронов (редокс-медиаторы).

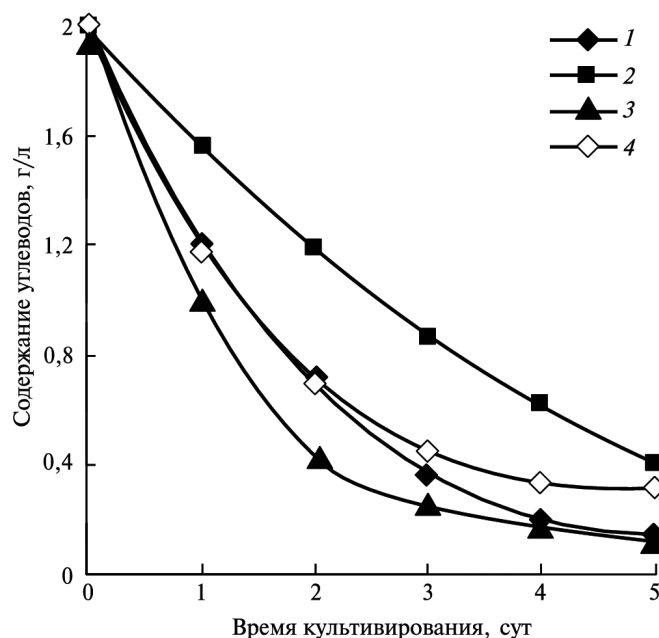


Рис. 2. Изменения содержания углеводов в среде при культивировании ассоциаций в качалочных колбах: 1 — ТА, 2 — ИОМ, 3 — ТИО, 4 — БА. Среда включала 0,15 М K_2HPO_4 (рН 5,3) и глюкозу в концентрации 2,5 г/л

К таким относятся как природные, так и искусственные соединения [1, 7–9].

Поскольку величина редокс-потенциала среды широко варьирует в зависимости от культуры исследуемых ассоциаций и субстрата окисления, представляет интерес исследовать эффект искусственных окислительно-восстановительных медиаторов N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамина (ТМФД), феназинметосульфата (ФМС) и бензилвиологена, которые активно используются в качестве проникающих через биологические мембраны электронных переносчиков. Эти соединения эффективно функционируют в разных

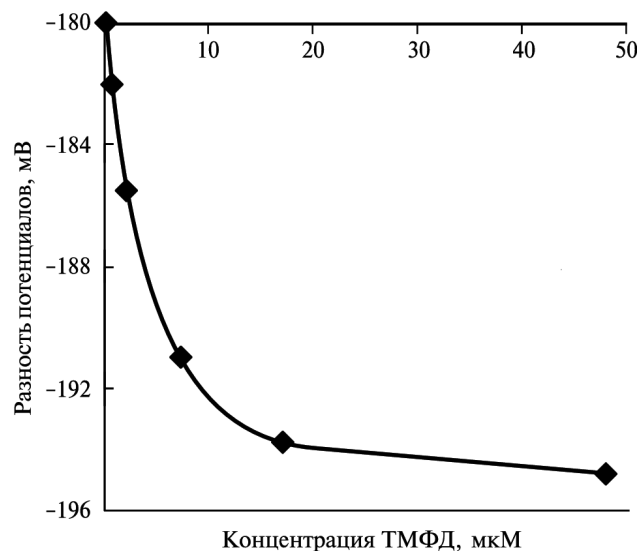


Рис. 3. Изменения разности потенциалов между анодом и катодом МТЭ от концентрации ТМФД. Среда содержала культуру ИОМ и ацетат; величина E_h среды в опыте составляла около 185 мВ

диапазонах E_h среды, близких к значению их стандартного редокс-потенциала: в районе 100–200 мВ для ТМФД, 0–(–100) мВ для ФМС и до –(300–350) мВ для бензилвиологена.

На рис. 3 показана зависимость разности потенциалов на электродах МТЭ от концентрации ТМФД для культуры ИОМ, инкубируемой с ацетатом в условиях, когда E_h среды составлял около 180 мВ. Редокс-медиатор добавляли после выхода РЭП и E_h среды на стационарный уровень, как это показано на рис. 1. Это соединение в концентрации 1–20 мкМ увеличивает разность потенциалов ~ на 10%, но не влияет на величину E_h (данные не представлены). ТМФД не оказывает влияния на изменения РЭП, генерируемой культурами ассоциаций на среде с глюкозой (данные не представлены), что обусловлено низкими значениями E_h среды, которые для разных культур, по дан-

ным таблицы, составляют –(330–400) мВ. При таких величинах E_h среды лишь очень незначительная часть ТМФД находится в окисленной форме, поскольку разница между E_h среды и стандартным редокс-потенциалом медиатора составляет более 200 мВ, а следовательно, концентрация его окисленной формы на несколько порядков ниже, чем концентрация восстановленной формы медиатора. По этой причине при отрицательных значениях E_h среды ТМФД не может участвовать в переносе электронов от клеток микроорганизмов, находящихся в объеме среды, к поверхности анодного электрода.

Добавление редокс-медиатора ФМС в диапазоне концентраций 2–12 мкМ позволило получить при значениях E_h среды порядка –80 мВ прирост разности потенциалов между электродами МТЭ около 15% (рис. 4, А). Эффект бензилвиологена, стандартный редокс-потенциал которого составляет –330 мВ, наблюдается для культуры ТА на среде с глюкозой при величине E_h среды около –360 мВ. В интервале концентраций бензилвиологена 2–40 мкМ увеличение РЭП между электродами МТЭ не превышает 3–4% (рис. 4, Б).

Таким образом, эти данные позволяют заключить, что искусственные окислительно-восстановительные переносчики электронов, такие как ТМФД, ФМС и бензилвиологен, способны в зависимости от величины E_h среды культивирования сложных микробных ассоциаций стимулировать образование РЭП на электродах МТЭ, вероятно, в результате челночного переноса электронов от находящихся в среде бактерий на поверхность анодного электрода.

Определить коэффициент полезного действия устройства МТЭ, учитывая сложный состав и характер метаболизма используемых нами природных микробных ассоциаций, не представляется возможным.

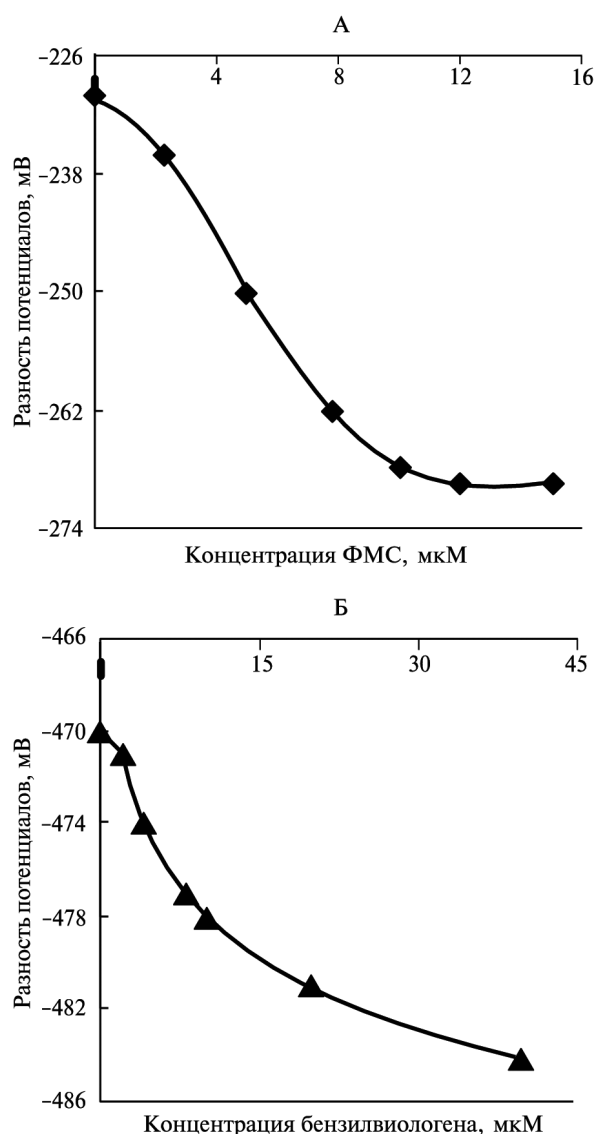


Рис. 4. Изменения разности потенциалов между анодом и катодом МТЭ от концентрации: А — ФМС (среда содержала культуру ТА и ацетат; величина E_h среды в опыте составляла около –84 мВ); Б — бензилвиологена (среда содержала культуру ТА и глюкозу; величина E_h среды в опыте составляла около –360 мВ)

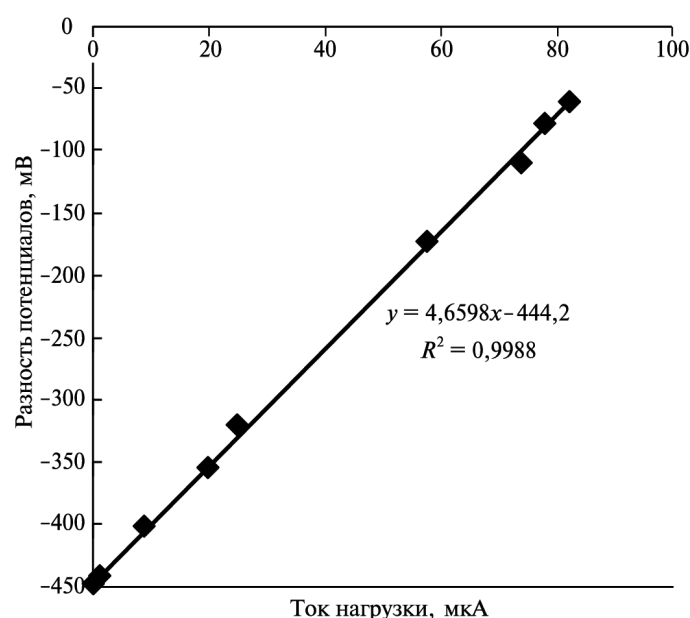


Рис. 5. Вольтамперная характеристика МТЭ. Остальные условия — как на рис. 1

В то же время вполне можно определить ряд электрических параметров, характеризующих систему в целом. На рис. 5 показана вольт-амперная характеристика МТЭ. Она представляет собой линейную зависимость тока нагрузки от разности потенциалов на электро-

дах с коэффициентом корреляции $> 0,99$. Прямое измерение тока и разности потенциалов на электродах в режиме “короткого замыкания” показывает, что внутреннее сопротивление МТЭ составляет приблизительно 1 Ком, а мощность достигает 5 мВт.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Angenent L.T., Karim K., AL-Dahhan M.H., Wrenn B.A., Domiguez-Espinosa R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater // Trends Biotechnol. 2004. Vol. 22. N 8. P. 477—486.
2. Phaem C.A., Jung S.J., Phung N.T., Lee J., Chang I.C., Kim B.H., Yi H., Chan J. FEMS Microbiol. Lett. 2003. Vol. 223. P. 129—134.
3. Rabaey K., Lissens G., Siciliano S.D., Verstraete W. A microbial fuel cells capable of converting glucose to electricity and high rate and efficiency // Biotechnol. Lett. 2003. Vol. 25. P. 1531—1535.
4. Kim J.R., Jung S.H., Regan J.M., Elogan B. Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells // Bioresource technol. 2007. Vol. 98. P. 2568—2577.
5. Fedorovich V.S., Knighton M.C., Pagaling E., Ward B., Free A., Goryanin I. Novel electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Arcobacter butzleri*, isolated from a microbial fuel cell // Appl. Environ. Microbiol. 2009. Vol. 75. N 23. P. 7326—7334.
6. Torres C.I., Marcus A.K., Rittmann B.E. Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 10. P. 1007 / s 00253-007-1198-x.
7. Roden E.E., Kappler A., Bauer I., Jiang J., Paul A., Stoesser R., Konishi H., Xu H. Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid phase humic substances // Nature geoscience. 2010. Vol. 3. P. 417—421.
8. Park D.H., Zeikus G. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore // Appl. Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66. N 4. P. 1292—1297.
9. Haipham T., Boon N., Alterman P., Clauwaert P., Schampelaire De L. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 77. P. 1119—1129.
10. Barsky E.L., Dol'nikova G.A., Savanina Ya.V., Belousova E.E., Karpova E.Yu., Dedov A.G., Lobakova E.S. Conversion of stillage carbohydrates by associations of microorganisms immobilized on polymer matrices // Mos. Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. Iss. 3. P. 124—130.
11. Методы химии углеводов / Под ред. Н.К. Кочеткова. М., 1967. 512 с.
12. Пиневиц А.В. Биология прокариот. Т. 2. СПб.: Изд. СПб ун-та, 2007. 329 с.
13. Барский Е.Л., Лебедева А.Ф., Саванина Я.В. Изменения окислительно-восстановительного потенциала среды культивирования устойчивой к тяжелым металлам бактерии *Pseudomonas diminuta*: взаимосвязь с выделением из клеток металлотионеиноподобных белков // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 1999. № 2. С. 11—15.
14. Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. Изменения редокс-потенциала и содержания углеводов в среде при периодическом и диализном культивировании цианобактерии *Anacystis nidulans* и бактерии *Pseudomonas diminuta* // Вестн. Моск. ун-та. 2002. Сер. 16. Биология. № 2. С. 24—29.

Поступила в редакцию
10.04.13

GENERATION OF ELECTRIC POTENTIAL DIFFERENCE ACROSS THE ELECTRODES OF THE MICROBIAL FUEL CELL IN THE ANAEROBIC OXIDATION OF SUBSTRATES BY MICROBIAL ASSOCIATIONS

E.L. Barsky, G.A. Dolnikova, Ya.V. Savanina, E.S. Lobakova

From natural and anthropogenic sources several microbial associations were obtained. All of associations, grow well on glucose and significantly worse on acetate. It is observed 80—95% glucose consumption during 3—5 days growth. The substrates oxidation by cultures generates an electric potential difference between the anode and cathode electrodes of the microbial fuel cell (MFE). The value of the potential difference depends on the nature of the association and the substrate and reaches 400—500 mV. Potential difference generation accompanied by a shift in the negative region of the medium redox potential (E_h) to $-(300-400)$ mV. This indicates H_2 evolution by association cultures during carbohydrates oxidation. Artificial redox mediators such as tetramethyl-p-phenylenediamine, phenazine methosulphate and benzyl viologen able to increase up to 15% difference in electrical potential across the electrodes MFE. It is assumed that the increase in the potential difference across the electrodes, induced redox mediators due to their direct involvement in the transfer of electrons from the bacteria in the incubation medium into MFE anode electrode. Direct measurement of current and potential difference on electrodes in a mode of “short circuit” shows that the internal resistance of MFE is equal to 1 Kohm, and power reaches 5 microwatt. Undoubtedly it testifies to the low efficiency developed by MFE.

Key words: *microbial associations, grow on glucose and acetate, microbial fuel cell, potential difference generation.*

Сведения об авторах

Барский Евгений Львович — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Дольникова Галина Александровна — ассист. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Саванина Янина Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-38-07; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru