

Ispitivanje uticaja CH_3COONa na produkciju struje bakterijskih zajednica mulja slatkovodnih ekosistema u Petnici i njihova karakterizacija

*U ovom radu praćena je produkcija struje bakterijskih zajednica, uzorkovanih iz mulja slatkovodnih ekosistema u okolini Istraživačke stanice Petnica. U svim gorivnim ćelijama detektovana je produkcija struje, koja je bila u porastu tokom prvih 8 do 16 časova. Nakon tog perioda produkcija struje opada. Praćenjem uticaja CH_3COONa na efikasnost mikrobioloških gorivnih ćelija primećeno je da sa rastom njegove koncentracije opada jačina struje. Maksimum produkcije, koji je postigla gorivna ćelija sa uzorcima iz bare u blizini gornjeg toka reke Poci-brava, bio je 1.24 mA. Takođe, dokazano je da su bakterije odgovorne za produkciju struje. U uzorcima mulja pronađene su bakterije iz rodova *Pseudomonas*, *Salmonella* i *Shigella*. Detaljnije mikrobiološke i hemijske analize uzoraka su neophodne radi boljeg razumevanja funkcionisanja, kao i poboljšanja efikasnosti mikrobioloških gorivnih ćelija ovog tipa.*

Uvod

U mulju se odvijaju procesi razgradnje organskih materija čime se ostvaruje kruženje materije i energije u vodenim ekosistemima. U procesu razlaganja složenih organskih i neorganskih jedinjenja osnovnu ulogu imaju bakterije (Jemcević i Đukić 2000). Tokom ovih procesa često dolazi do oslobađanja elektrona. Pokazano je da postoji razlika potencijala između mulja i sloja vode iznad. Mulj je obično u redukovanom, dok je voda iznad njega obično u oksidovanom stanju (Dentel *et al.* 2004). Stvaranjem veze između ove dve zone pomoću elektroda i provodnika u laboratorijskim uslovima moguće je formirati mikrobiološku gorivnu ćeliju (Dentel *et al.* 2004). Model mikrobiološke gorivne ćelije se zasniva na modelu elektro-hemijskog izvora energije. To je sistem koji konvertuje energiju hemijske reakcije u električnu energiju u obliku jednosmerne struje (Zečević *et al.* 2001). U prethodnim istraživanjima je pokazano da mnogi sojevi bakterija

*Marjan Biočanin (1991),
Beograd, Ilije
Stojadinovića 8, učenik 4.
razreda XIII beogradske
gimnazije*

*MENTOR:
Jelena Savić, dipl. biolog*

poput *Geobacter sulfurreducens*, *Pseudomonas* sp. ili *Shewanella* sp. poseduju mehanizme koji im omogućuju da vrše razgradnju određenih jedinjenja uz oslobađanje elektrona (Dentel *et al.* 2004; Lovley 2006; Logan *et al.* 2006). Sposobnost ovih sojeva iskoršćena je za produkciju struje (Logan i Regan 2007; Logan i Regan 2006).

Postoje dva načina transfera elektrona do elektrode. Prvi podrazumeva transfer elektrona pomoću posebnih redoks medijatora (Dentel *et al.* 2004). U tu grupu jedinjenja spada dibenzopirazin. Prethodna istraživanja su pokazala da on potpomaže transfer elektrona kod određenih sojeva *Pseudomonas* sp. (Rabaey *et al.* 2005). Drugi način podrazumeva direktnu kolonizaciju elektrode od strane bakterijskih sojeva (Dentel *et al.* 2004; Logan i Regan 2006). Kod soja *G. sulfurreducens* otkriveno je postojanje nano-mreža koje vode poreklo od pilusa. One omogućavaju transfer tih elektrona (Lovley 2006; Logan i Regan 2006). Ovakve mreže se mogu naći uglavnom ukoliko je ispitivani soj organizovan u vidu biofilma (Reguera *et al.* 2006). Ukoliko se taj biofilm postavi na anodu koja je prethodno povezana sa katodom omogućava se prelazak tih elektrona iz biofilma na anodu i njihov transfer na katodu, čime bi se uspostavilo kružno kretanje elektrona a samim tim i nastanak električne struje (Logan i Regan 2007; Reguera *et al.* 2006; Dentel *et al.* 2004). Cilj rada je praćenje produkcije struje bakterijskih zajednica uzorkovanih iz mulja slatkovodnih ekosistema u okolini Istraživačke stanice u Petnici (ISP).

Definisani su sledeći pojedinačni ciljevi:

- detekcija produkcije struje od strane bakterijskih zajednica mulja
- praćenje promene jačine struje u zavisnosti od vremena
- ispitivanje uticaja različitih koncentracija CH_3COONa na produkciju struje
- poređenje produkcije struje bakterijskih zajednica mulja uzorkovanih sa različitih lokacija u okolini ISP
- identifikacija bakterijskih sojeva mulja

Materijal i metode

Istraživanje se sastoji iz nekoliko segmenata. Najpre je uzorkovan mulj sa tri lokacije u okolini ISP. Na slici 1 prikazane su lokacije sa kojih je vršeno uzorkovanje. Uzorkovan je mulj iz priobalja Petničkog jezera (lokacija 1), bare u blizini gornjeg toka reke Pocibrava (lokacija 2), kao i iz ušća reke Banje u Pocibravu (lokacija 3). Takođe, na mestu uzorkovanja rađene su fizičko-hemijske analize mulja, što podrazumeva merenje temperature i pH vrednosti.

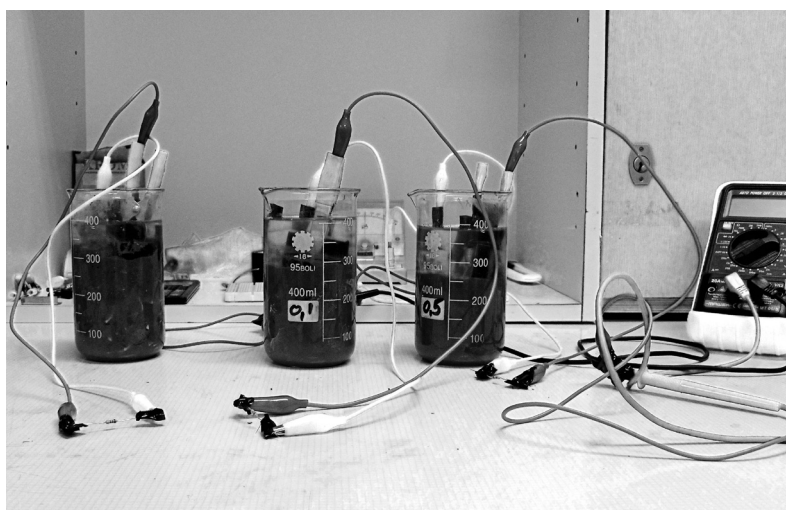
U narednom segmentu su konstruisane mikrobiološke gorivne ćelije. U sterilne čaše od 400 mL dodati su mulj i rastvor NaCl (1 g/L) u zapreminskom odnosu 2 : 1. Formirane su dve zone, aerobna u kojoj se nalazi



Slika 1.
 Mapa sa označenim lokacijama sa kojih je vršeno uzorkovanje mulja (mapa preuzeta sa maps.google.com)

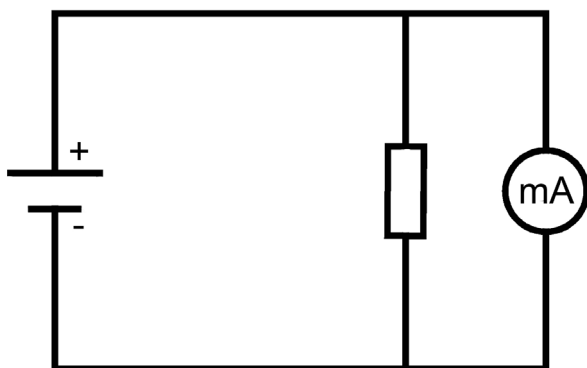
Figure 1.
 Map with marked sampling locations (map taken from maps.google.com)

rastvor NaCl i anaerobna u kojoj se nalazi uzorak mulja (slika 2). U uzorke mulja dodat je CH_3COONa . U dve čaše u anaerobnoj zoni je dodat CH_3COONa koncentracije 100 i 500 mg/L. Negativna kontrola je bila čaša u čije uzorke nije dodavan natrijum acetat. Nakon toga u aerobnu i anaerobnu zonu uronjene su grafitne pločice površine 48 cm^2 koje su služile kao elektrode. Elektroda na kojoj se odvija oksidacija je anoda, dok je elektroda na kojoj se odvija redukcija katoda (Zečević *et al.* 2001; Đorđević i Dražić 2005). Te pločice su međusobno povezane preko otpornika čiji je otpor bio 180Ω . Pored toga, paralelno su vezane sa multimetrom (Mawek MT06/S), pomoću koga je praćena promena jačine struje (slika 3) u zavisnosti od vremena. Pomenuta merenja su vršena narednih 72 h na svakih 8 h (0, 8, 16, 32, 40, 48, 56, 64 i 72 h).



Slika 2.
 Izgled mikrobioloških gorivnih ćelija korišćenih u istraživanju

Figure 2.
 Single chamber microbial fuel cells used in this research



Slika 3.
Šema kola gorivne
ćelije

Figure 3.
MFC (microbial fuel
cell) circuit diagram

Nakon završetka merenja, gorivne ćelije su tretirane visokom temperaturom u mikrotalasnoj pećnici. Nakon tretmana visokom temperaturom vršena je detekcija struje pomoću multimetra radi utvrđivanja odgovornosti bakterija za produkciju struje.

U nastavku istraživanja vršena je mikrobiološka analiza mulja. Uzorci su najpre rastvoreni u fiziološkom rastvoru, a zatim i bojeni po Gramu, Šefer-Fulton i Lefleru (Knežević-Vukčević i Simić 1997). Bakterijske kulture su zasejane na bogate hranljive podloge:

- LB (1% kazein hidrolizat, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl, 1000 mL destilovane H₂O)
- LA (LB sa dodatkom 1.5% agra)

Zasejane su i na selektivne i diferencijalne podloge:

- Mac Conkey agar
- Fenilalanin kosi agar
- King B (2% pepton, 0.15% K₂HPO₄, 0.15% 7H₂O · H₂SO₄, 1.5% agar, 1000 mL destilovane H₂O)
- Kligler
- Sulfitni agar
- Vilson Bler
- Simons-Citratni agar (0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% NH₄H₂PO₄, 0.01% K₂HPO₄, 0.02% Na-citrat, 0.05% NaCl, 0.0008% brom timol plavo, 1.5% agar, 1000 mL destilovane H₂O)

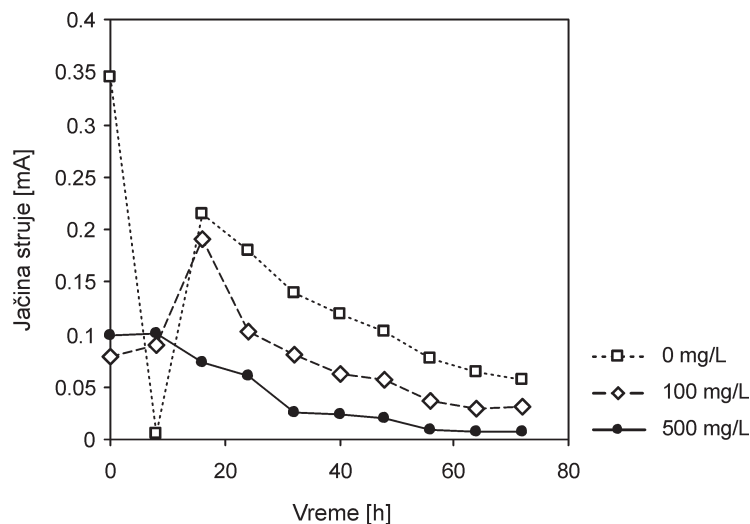
Pored toga, uzorci mulja su zasejani i na modifikovani kosi agar za bakterije iz roda *Geobacter* (0.015% NH₄Cl, 0.006% Na₂HPO₄, 0.001% KCl, 0.0082% CH₃COONa, NaHCO₃, 0.1% rastvor mikroelemenata, 0.1% vitaminski rastvor, 0.01% selenit-volframatski rastvor, 980 mL destilovane H₂O; Bond i Lovley 2003). Zasejavanjem uzoraka na pomenute hranljive podloge ispitivano je prisustvo pojedinih bakterijskih sojeva u uzorkovanom mulju. Na ovaj način se može saznati koje bakterije su potencijalno odgovorne za produkciju struje gorivne ćelije.

Tabela 1. Fizičko-hemijski parametri uzoraka

Parametar	Lokacija		
	1	2	3
pH	7.56	7.45	7.64
T (°C)	27.5	25.3	24.9

Rezultati i diskusija

U tabeli 1 prikazani su fizičko hemijski parametri uzoraka mulja. Dati uzorci su kasnije korišćeni u formiranju gorivne ćelije. Može se primetiti da je sredina slabo bazna. Poredeći parametre sa drugim radovima može se uočiti sličnost u njihovim vrednostima (Dentel *et al.* 2004).

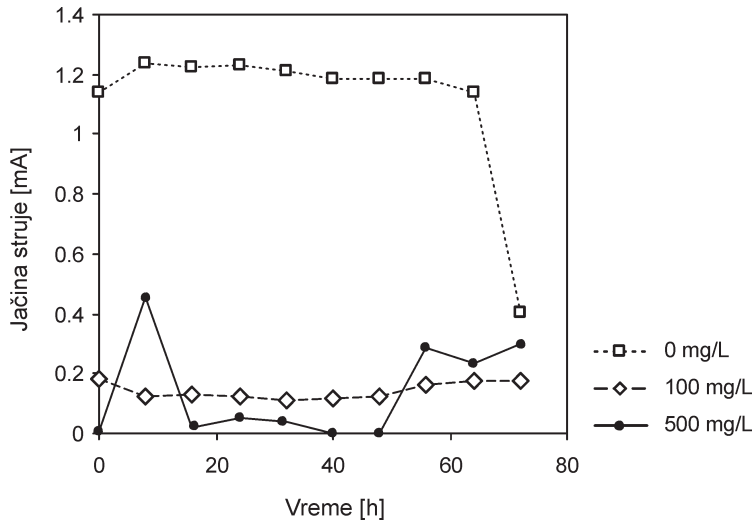


Slika 4.
Promena jačine struje u zavisnosti od vremena gorivne ćelije sa uzorcima iz prve lokacije

Figure 4.
Current intensity change in function of time in fuel cells which contain samples from first location with different acetate concentrations

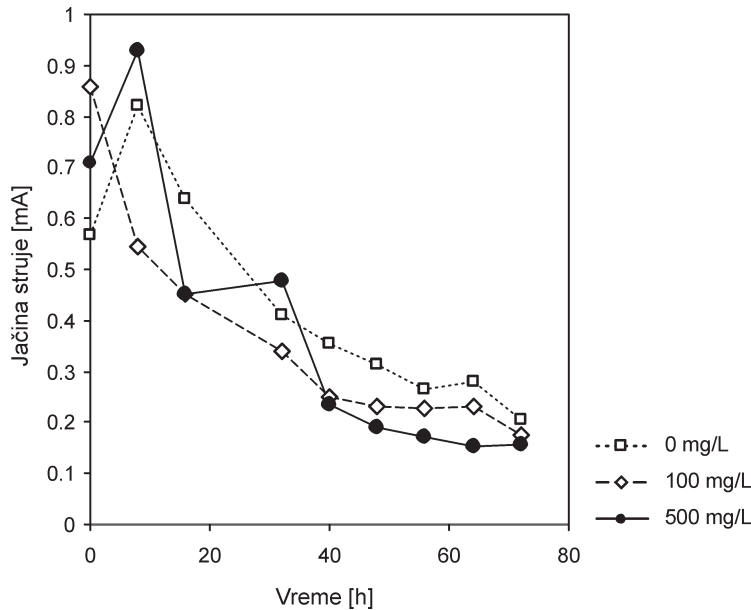
Na slikama 4-6 prikazana su merenja jačine struje u zavisnosti od vremena. Na sve tri slike se vidi znatan rast u produkciji struje tokom prvih 8 do 16 časova. Nakon tog perioda produkcija struje je u padu. Razlog za taj pad verovatno leži u smanjenju količine hranljivih materija, što dovodi do pada u aktivnosti i brojnosti bakterija u uzorku. Prethodna istraživanja su pokazala da će produkcija struje ostati nepromenjena u periodu od nekoliko nedelja ukoliko se periodično obnavljaju zalihe hranljivih supstanci (Bond i Lovley 2003).

Veličina anode takođe ima veliku ulogu u količini produkovane struje. Pokazano je da sa povećanjem površine anode raste i produkcija struje



Slika 5.
Promena jačine struje u zavisnosti od vremena gorivne ćelije sa uzorcima iz druge lokacije

Figure 5.
Current intensity change in function of time in fuel cells which contain samples from second location with different acetate concentrations



Slika 6.
Promena jačine struje u zavisnosti od vremena gorivne ćelije sa uzorcima iz treće lokacije

Figure 6.
Current intensity change in function of time in fuel cells which contain samples from third location with different acetate concentrations

(Reguera *et al.* 2006). Štaviše, preko 95% elektrona oslobođenih oksidacijom organske materije se može iskoristiti za produkciju struje (Lovley 2006). Međutim, gomilanjem određenih produkata razgradnje organskih materija u anaerobnoj zoni gorivne ćelije može doći do smrti određenih bakterijskih sojeva (Jemcević i Đukić 2000).

Posmatrajući i poredeći efikasnost ćelija može se primetiti da su bakterijski sojevi gorivnih ćelija sa uzorcima druge lokacije gde nije dodavan CH_3COONa produkovale najviše struje. Gorivne ćelije sa uzorcima iz Petničkog jezera produkovale su najmanje struje. Na slici 6 prikazani su

rezultati produkcije struje gorivnih ćelija sa treće lokacije. Gorivne ćelije sa uzorcima iz ušća Banje u Pocibravu su bile efikasne nezavisno od toga da li je i u kojoj meri dodavan natrijum acetat. Međutim, dobijene vrednosti su veoma niske u poređenju sa mnogim prethodnim radovima iz ove oblasti gde su mikrobiološke gorivne ćelije bile dosta efikasnije u produkovanju struje (Reguera *et al.* 2006; Bond i Lovley 2003; Chaudhuri i Lovley 2003; Aelterman *et al.* 2006).

Prema radu Lianga i saradnika, faktori koji mogu značajno uticati na unutrašnji otpor su elektrode, njihova udaljenost, biomasa kao i osobine supstrata od kog je sačinjena ćelija (Liang *et al.* 2007). Pored spoljašnjeg otpora, unutrašnji otpor ima veliki uticaj na efikasnost gorivnih ćelija (Liang *et al.* 2007; Lovley 2006). Tip elektroda, kao i hemijski sastav uzoraka mulja, imao je veliki uticaj na produkciju struje. Vrlo je verovatno da su i bakterijske vrste koje su se našle u uzorku, a nisu prirodni stanovnici mulja slatkovodnih ekosistema, imale značajnu ulogu u limitiranju proizvodnje struje (Lovley 2008).

Ukoliko se prati uticaj CH_3COONa na efikasnost ćelija, može se primetiti da sa rastom njegove koncentracije u anaerobnoj zoni opada jačina struje. Ova pojava je najizraženija u slučaju gorivnih ćelija sa uzorcima mulja iz Petničkog jezera. Kod ćelija sa uzorcima iz ušća reke Banje u Pocibravu je ova pojava najslabije izražena. Dobijeni rezultati su u suprotnosti sa podacima iz literature. Dokazano je da se natrijum acetat ponaša kao donor elektrona (Logan i Regan 2007; Bond i Lovley 2003). Takođe, prethodna istraživanja su pokazala da sa povećanjem koncentracije CH_3COONa raste i produkcija struje (Logan i Regan 2006; Bond i Lovley 2003). Možda su koncentracije natrijum acetata bile suviše visoke te je došlo do suprotnog efekta. Takođe, postoji mogućnost da je dodavanjem acetata narušena razgradnja i promet materije u uzorku. Ovo je za posledicu imalo smanjenu produkciju struje sa povećanjem koncentracije acetata.

Nakon pomenutih merenja gorivne ćelije su tretirane visokom temperaturom. Na ovaj način je vršeno ispitivanje odgovornosti bakterijskih sojeva iz uzorka za produkciju struje. Istraživanje Bonda i saradnika je pokazalo da visoke temperature inhibiraju produkciju struje (Bond *et al.* 2002). Posle tretmana visokom temperaturom u 3 od 9 gorivnih ćelija nije detektovan protok struje. U preostalih 6 ćelija je detektovan izuzetno nizak, praktično zanemarljiv protok struje.

Mikroskopiranjem uzoraka mulja pronađene su Gram pozitivne koke i bacili, kao i Gram negativni bacili. Posmatranjem uzorka bojenih po Šefer-Fultonovom pod mikroskopom ispitano je prisustvo sporulišućih bakterija u mulju. Ni u jednom od uzoraka nisu pronađene sporulišuće bakterije. Ovo ide u prilog činjenici da u mulju ovog tipa voda dominiraju

asporogeni zemljišni organizmi (Jemcević i Đukić 2000). Uzorci su zasejavani i na pomenute diferencijalne, selektivne i bogate hranljive podloge radi detaljnije karakterizacije bakterijskih zajednica odgovornih za produkciju struje. U sva tri uzorka pronađene su bakterije iz roda *Pseudomonas*. U uzorcima sa prve i druge lokacije su pronađene bakterije iz roda *Salmonella*. U uzorku iz treće lokacije su pronađene bakterije iz roda *Shigella*. U modifikovanom kosom agaru za bakterije iz roda *Geobacter* je primećen rast bakterijskih kultura. Postoji verovatnoća da su u sva tri uzorka pronađene pomenute bakterije. Međutim, ne može se sa sigurnošću tvrditi da su tu prisutne samo bakterije iz roda *Geobacter* s obzirom da podloga nije selektivna niti diferencijalna.

Zaključak

U svim formiranim gorivnim ćelijama detektovana je produkcija struje. Ona je bila u porastu tokom prvih 8 do 16 časova. Nakon tog perioda produkcija struje je bila u padu. Ukoliko se prati uticaj CH_3COONa na efikasnost ćelija može se primetiti da sa rastom njegove koncentracije opada jačina struje. Gorivne ćelije sa uzorcima iz prve lokacije produkovale su najmanje struje. Nasuprot tome, gorivne ćelije sa uzorcima iz treće lokacije su bile izuzetno efikasne nezavisno od toga da li je i u kojoj meri dodavan natrijum acetat. Maksimalna produkcija, koji je postigla gorivna ćelija sa uzorcima iz druge lokacije, bio je 1.24 mA. Dobiene vrednosti su i dalje vrlo niske u poređenju sa efikasnošću mnogih gorivnih ćelija ovog tipa. Pored toga, tretiranjem visokom temperaturom pokazano je da su bakterije ipak odgovorne za produkciju struje. Detaljnije mikrobiološke i hemijske analize uzoraka su neophodne radi boljeg razumevanja funkcionisanja, kao i poboljšanja efikasnosti mikrobioloških gorivnih ćelija ovog tipa.

Zahvalnost. Posebno se zahvaljujem Ivi Atanasković i Igoru Stamenovu koji su svojim savetima i sugestijama pomogli realizovanje ovog istraživanja. Takođe, ovom prilikom se zahvaljujem i preduzeću KROMA Ltd. na doniranim grafitnim pločicama bez kojih sprovođenje ovog istraživanja ne bi bilo moguće.

Literatura

- Aelterman P., Rabaey K., Pham H. T., Boon N, Verstraete W. 2006. Continuous Electricity Generation at High Voltages and Currents Using Stacked Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*, **40**: 3388.

- Bond D. R., Lovley D. R. 2003. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (3): 1548.
- Bond D. R., Holmes D. E., Tender L. M., Lovley D. R. 2002. Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science*, **295**: 483.
- Chaudhuri S. K., Lovley D. R. 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, **21** (10): 1229.
- Dentel S. K., Strogon B., Chi P. 2004. Direct generation of electricity from sludges and other liquid wastes. *Water Science and Technology*, **50** (9): 161.
- Đorđević S. Đ., Dražić V. J. 2005. *Fizička hemija*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu
- Jemcević V., Đukić D. A. 2000. *Mikrobiologija*. Beograd: Vojnoizdavački zavod
- Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji: prvi deo – praktikum*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- Liang P., Huang X., Fan M. Z., Cao X. X., Wang C. 2007. Composition and distribution of internal resistance in three types of microbial fuel cells. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **77**: 551.
- Logan B. E., Regan J. M. 2007. Microbial challenges and fuel cells – applications. *Environmental Science & Technology*, **40** (17): 5172.
- Logan B., Melers B., Rozendal R., Schroder U., Keller J., Freguia S., Aelterman P., Verstraete W., Rabaey K. 2006. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environmental Science & Technology*, **40** (17): 5181.
- Logan B. E., Regan J. M. 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, **14** (12): 512.
- Lovley D. R. 2006. Microbial Energizers: Fuel Cells That Keep on Going. *Microbe*, **1** (7): 223.
- Lovley D. R. 2008. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**: 564.
- Lovley D. R. 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, **4**: 497.
- Reguera G., Nevin K. P., Nicoll J. S., Covalla S. F., Woodard T., Lovley D. R. 2006. Biofilm and Nanowire Production Leads to Increased Current in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (11): 7345.
- Rabaey K., Boon N., Höfte M., Verstraete W. 2005. Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells. *Environmental Science & Technology*, **39** (9): 3401.
- Zечевић S., Gojković S., Nikolić B. 2001. *Elektrohemijsko inženjerstvo*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu

Marjan Biočanin

Effect of CH₃COONa on Electrical Current Production of Freshwater Sludge Bacterial Communities from Petnica and Identification of these Communities

In this research, the electrical current production of freshwater sludge bacterial communities from Petnica was surveyed. Electric current was detected in all microbial fuel cells. Sodium acetate inhibited the current production. The maximal production was 1.24 mA. It was also shown that bacterial communities were responsible for the observed electrical current production in fuel cells. Bacteria from genera *Pseudomonas*, *Salmonella* and *Shigella* were identified in sludge samples. More detailed microbiological and chemical analysis are required for better understanding and improving this type of fuel cells.

