

## Redukcija Cr-(VI) i produkcija struje u aerobnim i anaerobnim dvokomornim mikrobiološkim gorivnim ćelijama

---

*Hrom (Cr) je u šestovalentnoj formi toksičan, dok trovalentni Cr ima manje izraženo toksično dejstvo. Remedijacija ekosistema zagađenih Cr-(VI) zasniva se na njegovoj redukciji u trovalentnu formu, za šta se mogu koristiti bakterije. U ovom istraživanju pokazano je da bakterijski sojevi Pseudomonas sp, Bacillus stearothermophilus, Serratia plymuthica i Serratia fonticola koji redukuju Cr-(VI) mogu dovesti do pojave struje u mikrobiološkim gorivnim ćelijama. U ovim gorivnim ćelijama ispitivani sojevi su se nalazili u anodnoj komori, gde su oslobađali elektrone i usmeravali ih ka anodi ujedno redukujući Cr-(VI). Na ovaj način su u jednoj gorivnoj ćeliji integrisani procesi produkcije struje i redukcija Cr-(VI). Smanjenjem koncentracije Cr-(VI) njegova redukcija u ćeliji se usporava ili zaustavlja, što je praćeno i padom intenziteta struje. U potpunom odsustvu Cr-(VI) ne dolazi do produkcije struje kod ispitivanih sojeva. Opisani model gorivne ćelije mogao bi naći primenu kao protočni sistem za prečišćavanje otpadnih voda, gde bi električna energija za pokretanje sistema bila poreklom iz same gorivne ćelije.*

---

### Uvod

Hrom (Cr) je metal koji pri visokim koncentracijama ispoljava citotoksično, mutageno i kancerogeno dejstvo. U prirodi se javlja u dva oblika, kao trovalentni i šestovalentni hrom. Cr-(VI) ima izraženije toksično i citotoksično dejstvo od Cr-(III), jer se bolje rastvara u vodi i lakše prolazi kroz ćelijske membrane. Zato se metode remedijacije staništa zagađenih šestovalentnim hromom zasnivaju na nje-

govnoj redukciji u trovalentnu formu. Za remedijaciju se mogu koristiti bakterije koje razgrađuju dostupne izvore ugljenika uz oslobađanje elektrona, kojima redukuju Cr-(VI) pomoću vanćelijskih ili membranskih enzima reduktaza (Silver i Phung 2005).

Bakterijski sojevi koji redukuju teške metale mogu učestvovati u procesu produkcije struje u mikrobiološkim gorivnim ćelijama (Chaudhuri i Lovley 2007). Mikrobiološke gorivne ćelije su elektrohemijski izvori energije. U njima se usled bakterijskog metabolizma iz nekog izvora ugljenika oslobađaju elektroni u oblasti anode. Elektroni se potom prenose kroz provodnik do katode i finalnog akceptora, najčešće kiseonika. Na ovaj način se u gorivnoj ćeliji hemijska energija konvertuje u električnu energiju jednosmerne struje (Lovley 2006). Uloga bakterija u mikrobiološkoj gorivnoj ćeliji je oslobađanje, ali i transportovanje elektrona do anode. U taj transport uključene su bakterijske reduktaze, među kojima se nalaze i reduktaze aktivne pri redukciji nekog teškog metala (Holmes *et al.* 2006).

Može se pretpostaviti da bakterije koje redukuju neki metal ujedno mogu i da transportuju elektrone do anode. Tačnost ove pretpostavke omogućila bi da se proces redukcije nekog toksičnog teškog metala i proces proizvodnje struje integrišu u jedinstvenoj gorivnoj ćeliji. U većini gorivnih ćelija krajnji akceptor katodnih elektrona je kiseonik, no to može biti i Cr-(VI) koji se redukcijom prevodi u manje toksičnu formu. Stoga je moguće konstruisati gorivnu ćeliju kod koje je proizvodnja struje praćena redukcijom Cr-(VI) i u anodnoj i katodnoj komori (Tandukar *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011).

Cilj ovog istraživanja bila je konstrukcija dvokomornih gorivnih ćelija u kojima struju produkuju bakterije sposobne da redukuju Cr. Redukcija Cr-(VI) je upoređivana u anodnom i katodnom delu ćelije, jer u oblasti anode Cr-(VI) redukuju bakterije,

---

*Iva Atanasković (1993), Beograd, Kneza Miloša 64, učenica 4. razreda gimnazije Sveti Sava u Beogradu*

#### MENTORI:

*dr Blažo Lalević, docent na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu*

*Marjan Biočanin, student 2. godine Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu*

dok se u oblasti katode redukcija odvija abiotički, pomoću katodnih elektrona. U katodnoj polučeliji, pored Cr-(VI), akceptor elektrona može biti i kiseonik, pa su upoređivane gorivne ćelije u kojima je katoda aerobna ili anaerobna. Još jedan cilj bilo je upoređivanje odnosa efikasnosti redukcije Cr-(VI) i produkcije struje kod dve grupe bakterijskih sojeva. Prvu grupu su činili sojevi *Pseudomonas* sp. i *B. stearothermophilus*, koji reduktaze za redukciju Cr-(VI) oslobađaju u spoljašnju sredinu (Garbisu *et al.* 1998; Ishibashi *et al.* 1990), a drugu grupu sojevi *S. plymuthica* i *S. fonticola*, kod kojih su te reduktaze u sastavu ćelijske membrane (Mondaca *et al.* 2002).

## Materijal i metode

**Screening test za redukciju Cr-(VI).** U istraživanju su korišćeni sojevi *Pseudomonas* sp, *Serratia plymuthica*, *Serratia fonticola* i *Bacillus stearothermophilus* iz kolekcije Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Sojevi su izolovani sa istog lokaliteta, rudnika boksita u Milićima (Bosna i Hercegovina). Njihova sposobnost redukcije Cr-(VI) je već okarakterisana u istraživanju Raičević *et al.* (2010).

Pre konstrukcije gorivnih ćelija bilo je neophodno ustanoviti subinhibitornu koncentraciju Cr-(VI) pri kojoj je efikasnost redukcije najveća. Stoga je ispitivan uticaj različitih koncentracija Cr-(VI) na bakterijski rast i efikasnost redukcije. Cr-(VI) je u LB podloge (10 g kazein hidrolizata, 5 g ekstrakta kvsca, 5 g NaCl u 1000 mL destilovane H<sub>2</sub>O; Knežević i Simić 1997) dodavan u obliku K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, u koncentracijama 320, 160, 80, 40, 20 i 0 mg/L. Potom je u ove podloge inokulisana određena bakterijska suspenzija u koncentraciji 10 % (v/v). Suspenzije su pripremane rastvaranjem čvrstih bakterijskih kultura u fiziološkom rastvoru. Čvrste kulture bile su stare 24 h i kultivisane na hranljivoj podlozi (15 g peptona, 3 g mesnog ekstrakta, 5 g NaCl, 0.3 g K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 18 g agra u 1000 mL destilovane H<sub>2</sub>O; Knežević i Simić 1997) sa dodatkom 320 mg/L K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Suspenzije različitih bakterijskih sojeva podešene su na istu optičku gustinu (A<sub>600nm</sub> = 0.1). Formirana je i serija abiotičkih kontrolnih grupa, u koje nisu inokulisane bakterije.

Koncentracija K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> određivana je difenilkarbazid metodom (Garbisu *et al.* 1998) nakon 6 h inkubacije. Efikasnost redukcije Cr-(VI) određena je kao odnos razlike početne i koncentracije preostalog

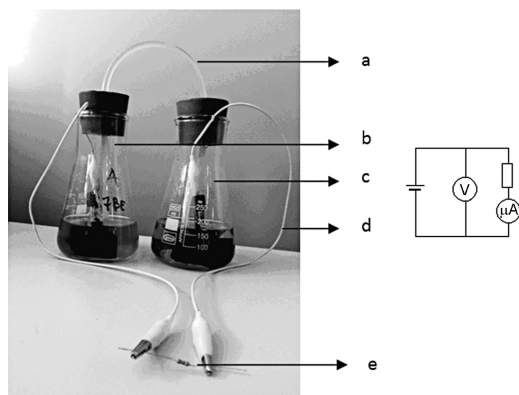
K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> prema početnoj koncentraciji K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, i izražena je u procentima.

Rast sojeva praćen je spektrofotometrijski (Knežević i Simić 1997), merenjem apsorbance bakterijske suspenzije na 600 nm nakon 12 h inkubacije.

**Konstrukcija gorivnih ćelija i uslovi kulture.** Konstruisane su dvokomorne gorivne ćelije (Logan *et al.* 2006), prema shemi prikazanoj na slici 1. Kao anodna i katodna komora korišćeni su erlenmajeri zapremine 250 mL. Komore su povezane slanim mostom unutrašnjeg prečnika 6 mm, koji je bio ispunjen 3 % rastvorom agra u 1 M NaCl. U obe komore postavljene su grafitne elektrode dimenzija 9 × 7 × 2 cm povezane bakarnim provodnikom i otpornikom (330 Ω), čime je konstruisano električno kolo prikazano na slici 1. Obe komore ispunjene su sa 150 mL LB podloge u koje je dodato 160 mg/L K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. U anodne komore inokulisano je 5 % odgovorajućih bakterijskih suspenzija, podešenih na istu optičku gustinu (A<sub>600nm</sub> = 0.1) i pripremanih kao u screening testu. Za svaki soj konstruisane su po dve gorivne ćelije – jedna sa aerobnom i jedna sa anaerobnom katodnom komorom. Anaerobni uslovi u katodnoj komori oformljeni su zagrevanjem tečne faze do ključanja i prekrivanjem te faze slojem parafinskog ulja. Da bi se ispitalo da li je prisustvo Cr-(VI) kod ispitivanih sojeva neophodno za produkciju struje, oformljene su i eksperimentalne grupe u koje K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> nije dodavan. Formirane su i abiotičke kontrolne grupe, u koje nije dodavana bakterijska suspenzija, da bi se ustanovila eventualna abiotička produkcija struje i abiotička redukcija Cr-(VI).

**Analitičke metode.** Merenja su vršena na 2 h u periodu od 12 h. Praćena je koncentracija K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> u anodnim i katodnim polučelijama, gde je smanjenje u koncentraciji pokazatelj efikasnosti redukcije Cr-(VI). Koncentracija K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> je određivana difenilkarbazid metodom (Garbisu *et al.* 1998). Uzorak iz svake polučelije je najpre centrifugiran (15 000 g, 15 min), a potom je 0.5 mL supernatanta razblaženo u 10 mL destilovane H<sub>2</sub>O uz dodatak 0.25 % (m/V) acetonskog rastvora 1,5-difenilkarbazida i dve kapi 86% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Koncentracija K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> je potom određivana spektrofotometrijski, merenjem apsorbance reakcione smeše na 540 nm. Efikasnost redukcije Cr-(VI) je praćena kao pad koncentracije K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> sa vremenom. Bakterijski rast u anodnoj polučeliji praćen je merenjem apsorbance suspenzije na 600 nm.

Struja i napon gorivnih ćelija mereni su multimetrom (Mawek MT06/S). Unutrašnji otpor ćelija



Slika 1. Dvokomorna gorivna ćelija (a – slani most, b – anodna polućelija, c – katodna polućelija, d – provodnik, e – otpornik) i shema kola gorivne ćelije

Figure 1. Two chambered microbial fuel cell (a – salt bridge, b – anode chamber, c – cathode chamber, d – conductor, e – resistor) and the circuit diagram

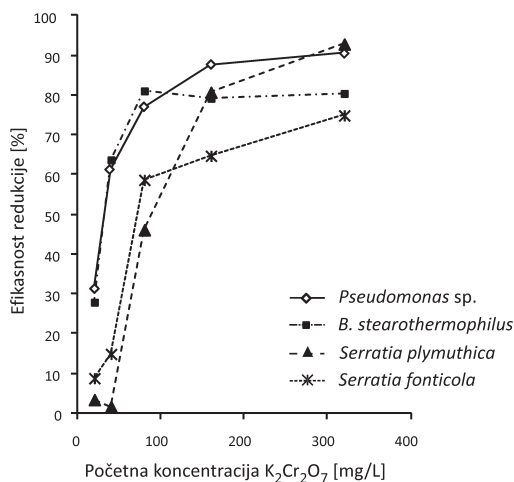
računat je iz formule:  $r = U/I - R$ , gde je  $U$  izmereni napon,  $I$  izmereni intenzitet struje, a  $R$  otpor spoljašnjeg dela kola (Logan *et al.* 2006).

## Rezultati i diskusija

**Uticaj početne koncentracije  $K_2Cr_2O_7$  na efikasnost redukcije Cr(VI) i bakterijski rast.** Na slici 2 prikazana je efikasnost redukcije Cr nakon 6 h inkubacije, u postavkama sa različitim početnim koncentracijama  $K_2Cr_2O_7$  i sa različitim bakterijskim sojevima. U abiotičkoj kontroli nije došlo do promene u koncentraciji  $K_2Cr_2O_7$  (podaci nisu prikazani), pa je smanjenje njegove koncentracije u eksperimentalnim grupama posledica redukcije pomoću ispitivanih bakterijskih sojeva (Raičević *et al.* 2010).

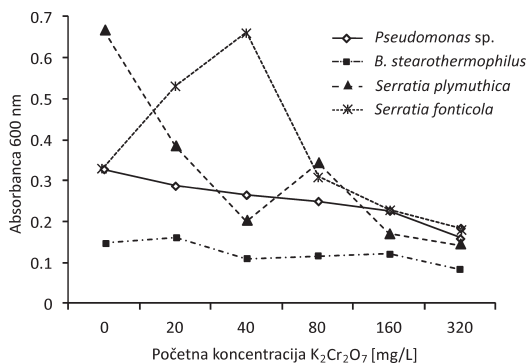
Kod svih sojeva efikasnost redukcije opada sa koncentracijom  $K_2Cr_2O_7$ . Sojevi *S. plymuthica* i *S. fonticola* efikasnije su redukovali više koncentracije, dok dve najniže koncentracije nisu redukovane. Najviša efikasnost redukcije zapažena je kod sojeva *S. plymuthica* i *Pseudomonas sp.*, i to u slučaju najviše ispitivane koncentracije. Sličan odnos efikasnosti redukcije Cr(VI) je kod ispitivanih sojeva zapažen i u istraživanju Raičević *et al.* (2010).

Na slici 3 prikazan je uticaj različitih početnih koncentracija  $K_2Cr_2O_7$  na rast ispitivanih sojeva. Kod sojeva *Pseudomonas sp.* i *B. stearothermophilus*



Slika 2. Efikasnost redukcije različitih početnih koncentracija  $K_2Cr_2O_7$

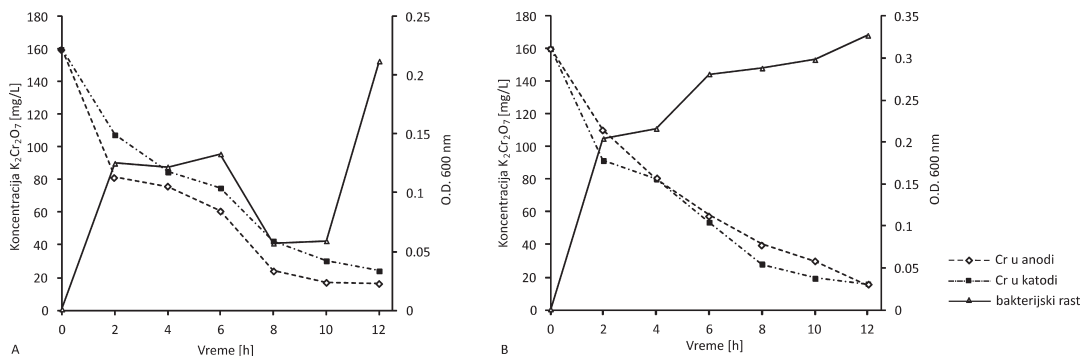
Figure 2. Reduction efficiency for different initial concentrations of  $K_2Cr_2O_7$



Slika 3. Apsorbancu bakterijske suspenzije u uslovima sa različitim početnim koncentracijama  $K_2Cr_2O_7$ .

Figure 3. Optical density of the bacterial suspension for different concentrations of  $K_2Cr_2O_7$ .

nije uočena značajna inhibicija rasta u prisustvu Cr(VI). Sojevi *S. plymuthica* i *S. fonticola*, iako pripadaju istom rodu, različito su rasli u prisustvu Cr(VI). Tako su kod soja *S. plymuthica* sve koncentracije ispoljile inhibitoryno dejstvo, dok je kod soja *S. fonticola* to slučaj samo sa najvišim koncentracijama. Kod *S. fonticola* pri nižim koncentracijama



Slika 4. Redukcija Cr(VI) i bakterijski rast u aerobnoj (A) i anaerobnoj (B) gorivnoj ćeliji sa *Pseudomonas* sp.

Figure 4. Reduction of Cr(VI) and growth of *Pseudomonas* sp. in aerobic (A) and anaerobic (B) fuel cells

K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> zapažen je i porast apsorbance bakterijske suspenzije. Moguće je da je K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> stimulisao bakterijski rast, što je opisano i u prethodnim istraživanjima (Chaturvedi 2011).

Na osnovu prethodnih istraživanja očekivano je da je u grupama sa najefikasnijom redukcijom Cr(VI) i bakterijski rast najintenzivniji (Ur Rahman *et al.* 2007; Xu *et al.* 2009). No ovakva veza između apsorbance bakterijske suspenzije i efikasnosti redukcije Cr(VI) nije uočena. Soj *S. fonticola* efikasnije je redukovao više koncentracije Cr(VI), iako mu je optička gustina bakterijske suspenzije pri ovim koncentracijama niža. Kod soja *S. plymuthica*, koji je ispoljio najvišu efikasnost redukcije Cr(VI) pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji, uočena je približno ista optička gustina suspenzije kao i kod ostalih sojeva.

S obzirom na to da je najviša ispitivana koncentracija K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> inhibirala bakterijski rast, a da je redukcija bila manje efikasna pri nižim koncentracijama, za konstrukciju gorivnih ćelija izabrana je koncentracija 160 mg/L.

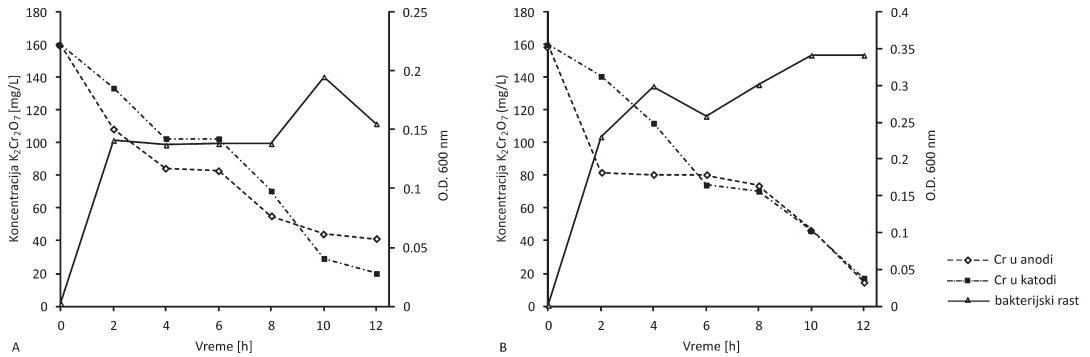
**Redukcija Cr(VI) i bakterijski rast u gorivnim ćelijama.** U aerobnim i anaerobnim gorivnim ćelijama praćen je odnos koncentracije K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> u anodnoj i katodnoj komori, kao i odnos efikasnosti redukcije i bakterijskog rasta. U svim eksperimentalnim grupama uočen je pad koncentracije K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. S obzirom na to da u abiotičkoj kontroli nije došlo do promene u koncentraciji K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (podaci nisu prikazani), njen pad se pripisuje redukciji Cr(VI) od strane ispitivanih bakterijskih sojeva.

U svim eksperimentalnim grupama uočen je porast optičke gustine bakterijske suspenzije tokom određenih faza inkubacionog perioda, praćen kontinuiranim opadanjem koncentracije K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, što je opisano i u ranijim istraživanjima (Xu *et al.* 2009).

Na slici 4 prikazana je vremenska promena koncentracije K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> i apsorbance bakterijske suspenzije u gorivnim ćelijama sa sojem *Pseudomonas* sp. U aerobnoj ćeliji redukcija je bila efikasnija u oblasti anode, dok je u anaerobnoj ćeliji bila efikasnija u katodnoj komori, mada se to ne uočava tokom čitavog inkubacionog perioda. Ovo ukazuje da je O<sub>2</sub> kao dodatni akceptor elektrona smanjio efikasnost redukcije u katodnoj komori. Efikasnija redukcija u katodi ujedno ukazuje da je grafitna elektroda bila pogodniji akceptor elektrona od Cr(VI) za ispitivani soj. Takođe je uočeno da efikasnost redukcije opada sa vremenom, gde je redukcija u slučaju obe ćelije bila najefikasnija u prva 2 h inkubacije.

Tokom perioda od 2 do 6 h inkubacije u aerobnoj ćeliji je uočljiva stacionarna faza u bakterijskom rastu. Nakon ove stacionarne faze apsorbance bakterijske suspenzije počinje da opada, ali se redukcija K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> nastavlja. Moguće je da je pad apsorbance posledica promene fenotipa bakterijske populacije u formu biofilma, koji je uočen na površini anode nakon 6 h inkubacije (Meyer *et al.* 2011).

Na slici 5 prikazana je promena koncentracije K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> i apsorbance bakterijske suspenzije u gorivnim ćelijama sa sojem *B. stearothermophilus*. I kod ovog soja redukcija u aerobnoj gorivnoj ćeliji bila je efikasnija u oblasti anode, no sa padom broj-



Slika 5. Redukcija Cr(VI) i rast kod soja *B. stearothermophilus* u aerobnim (A) i anaerobnim (B) gorivnim ćelijama

Figure 5. Cr(VI) reduction and growth of *Bacillus stearothermophilus* in aerobic (A) and anaerobic (B) fuel cells

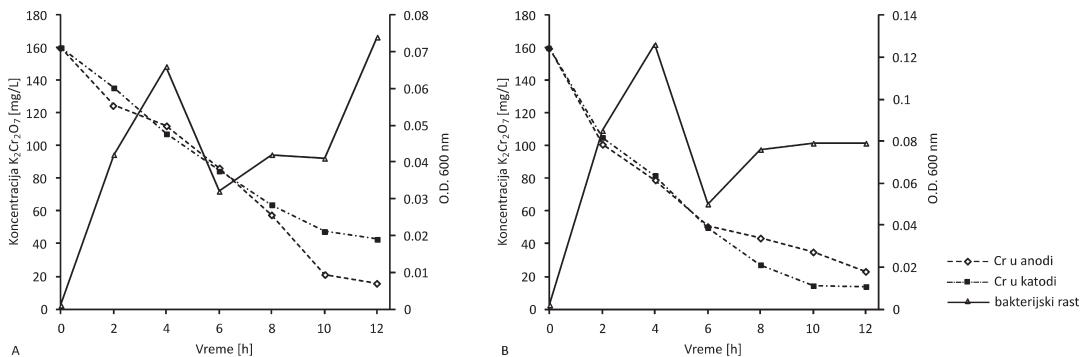
nosti bakterijske populacije redukcija je efikasnija u oblasti katode.

U anaerobnoj ćeliji redukcija je bila efikasnija u oblasti anode, no samo u prvoj polovini inkubacionog perioda. Nakon toga efikasnosti redukcije anode i katode se izjednačavaju. U anaerobnoj ćeliji uočena je i stacionarna faza u redukciji Cr, koja je praćena padom apsorbance bakterijske suspenzije. Nakon ponovnog porasta apsorbance nastavlja se i redukcija Cr.

Kao i kod soja *Pseudomonas* sp, redukcija je najefikasnija u prva 2 h inkubacije, što je naročito izraženo kod anaerobne gorivne ćelije. Za razliku od soja *Pseudomonas* sp, kod *B. stearothermophilus* Cr je podjednako efikasno redukovan i u aerobnoj i u anaerobnoj ćeliji.

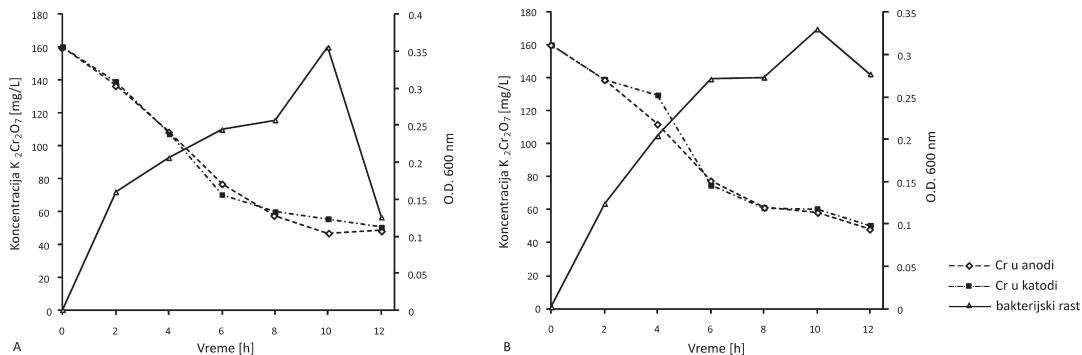
Na slici 6 prikazana je vremenska promena koncentracije  $K_2Cr_2O_7$  i apsorbance bakterijske suspenzije u gorivnim ćelijama sa sojem *S. plymuthica*. Kao i kod soja *Pseudomonas* sp. uočava se efikasnija redukcija u anodi kod aerobne i u katodi kod anaerobne ćelije, samo što je kod soja *S. plymuthica* to izraženo tek u drugoj polovini inkubacionog perioda.

Na slici 7 prikazana je promena koncentracije  $K_2Cr_2O_7$  i apsorbance bakterijske suspenzije u gorivnim ćelijama sa sojem *S. fonticola*. Kod ovog soja efikasnosti redukcije u oblasti katode i anode ujednačene su i u aerobnoj i u anaerobnoj gorivnoj ćeliji, verovatno zato što su grafitna elektroda i Cr(VI) podjednako pogodni akceptori elektrona za reduktaze ovog soja. Iako su vrednosti apsorbancija tokom



Slika 6. Redukcija Cr(VI) i rast kod soja *Serratia plymuthica* u aerobnim (A) i anaerobnim (B) gorivnim ćelijama

Figure 6. Cr(VI) reduction and growth of *Serratia plymuthica* in aerobic (A) and anaerobic (B) fuel cells



Slika 7. Redukcija Cr(VI) i rast kod soja *S. fonticola* u aerobnim (A) i anaerobnim (B) gorivnim ćelijama

Figure 7. Cr(VI) reduction and growth of *Serratia fonticola* in aerobic (A) and anaerobic (B) fuel cells

većeg dela inkubacionog perioda u obe ćelije slične, redukcija je bila efikasnija u anaerobnoj ćeliji.

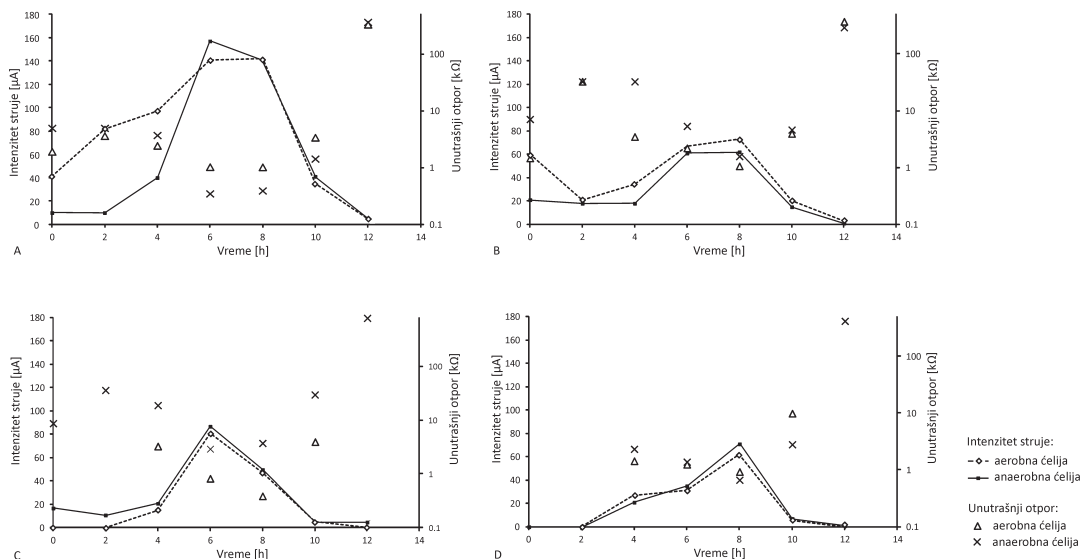
Najefikasnija, odnosno najneefikasnija redukcija Cr(VI) kod ispitivanih sojeva ne može se pripisati brojnosti njihovih populacija u anodnim polućelijama. Na primer, kod soja *Pseudomonas* sp. apsorbanca bakterijske suspenzije bila je znatno veća nego kod soja *S. plymuthica*, koji je ispoljio veću efikasnost redukcije. Stoga moguće je da su razlike u efikasnosti redukcije kod ispitivanih sojeva pre posledica različitih mehanizama redukcije, nego posledica različitog intenziteta rasta u gorivnim ćelijama.

**Veza produkcije struje i redukcije Cr(VI) u gorivnim ćelijama.** U abiotičkim kontrolnim grupama nije detektovana struja, pa je njena produkcija u eksperimentalnim grupama isključivo posledica bakterijske aktivnosti. Na slici 8 prikazana je promena intenziteta struje u gorivnim ćelijama sa različitim bakterijskim sojevima. U svim eksperimentalnim grupama detektovan je porast intenziteta struje koji uglavnom počinje nakon 2 h inkubacije, no on opada nakon određenog vremena. Ovaj pad praćen je porastom unutrašnjeg otpora, pa je na osnovu prethodnih istraživanja pretpostavljeno da je visok unutrašnji otpor uzrok pada struje u gorivnim ćelijama (Liang *et al.* 2007). Do porasta unutrašnjeg otpora verovatno je došlo usled oslobađanja različitih produkata bakterijskog metabolizma u hranljivi medijum (Nimje *et al.* 2011).

U svim gorivnim ćelijama pad struje dešava se kada je koncentracija  $K_2Cr_2O_7$  ispod 50 mg/L. Pad koncentracije Cr ispod ove granice praćen je i prestankom redukcije Cr, odnosno u opsegu niskih kon-

centracija prestaje dalja promena koncentracije  $K_2Cr_2O_7$  (slike 4 do 7). Stoga je pretpostavljeno da pad koncentracije Cr ispod određene granice i prestanak njegove redukcije kao posledicu ima prestanak produkcije struje, kao i da u potpunom odsustvu Cr struja neće biti produkovana. Ova pretpostavka je potvrđena, jer u grupama sa medijumom koji nije sadržao  $K_2Cr_2O_7$  kod svih ispitivanih sojeva nije došlo do produkcije struje (podaci nisu prikazani). Prisustvo Cr(VI) je kod ovih sojeva neophodno za produkciju struje verovatno zato što se pri redukciji Cr(VI) i pri transportu elektrona na anodu koriste iste reduktaze. Takođe, pretpostavljamo da se u odsustvu Cr(VI) ove reduktaze ne sintetišu ili nisu aktivne, pa stoga izostaje i sposobnost sojeva da prenose elektrone na anodu (Conceicao *et al.* 2009). Data pretpostavka odgovara i rezultatima screening testa, gde neki od ispitivanih sojeva nisu mogli da redukuju najniže ispitivane koncentracije (20 i 40 mg/L)  $K_2Cr_2O_7$ .

Intenzivnija redukcija Cr(VI) nije praćena i intenzivnijom produkcijom struje. Tako je soj *S. plymuthica* najintenzivnije redukovao Cr (slika 6) i slabije produkovao struju (slika 8-C) u odnosu na ostale sojeve. Ova pojava je uočljiva i ako se upoređuju aerobna i anaerobna ćelija kod istog bakterijskog soja. Tako je kod soja *B. stearothermophilus* efikasnija produkcija struje bila u aerobnoj ćeliji (slika 8-B), dok je efikasnija redukcija Cr bila u anaerobnoj ćeliji (slika 5). Moguće da reduktaze svakog od ispitivanih sojeva pokazuju afinitet ili ka prenosu elektrona na anodu, ili ka prenosu elektrona



Slika 8. Promena intenziteta struje i unutrašnjeg otpora u aerobnim i anaerobnim gorivnim ćelijama (A – *Pseudomonas sp.*, B – *Bacillus stearothermophilus*, C – *Serratia plymuthica*, D – *Serratia fonticola*)

Figure 8. Circuit intensity and internal resistance in aerobic and anaerobic fuel cells (A – *Pseudomonas sp.*, B – *Bacillus stearothermophilus*, C – *Serratia plymuthica*, D – *Serratia fonticola*)

na Cr, i zbog toga se jedan od ova dva procesa dešava sa većom efikasnošću.

Kod sojeva koji sadrže vanćelijske reduktaze (*Pseudomonas sp* i *B. stearothermophilus*) efikasnost produkcije struje veća je u aerobnim, dok je kod soja sa membranskim reduktazama (*S. plymuthica*) produkcija efikasnija u anaerobnim ćelijama. Sledi da je prisustvo O<sub>2</sub> kao dodatnog akceptora elektrona stimulisalo produkciju struje kod sojeva *Pseudomonas sp.* i *B. stearothermophilus*. No dati odnosi se ni kod jedne od ćelija ne ispoljavaju tokom čitavog inkubacionog perioda.

U prethodnim postupcima redukcije Cr(VI) u katodi gorivne ćelije, u katodnu komoru su inokulisani mikroorganizmi koji redukuju Cr, dok su kao producenti struje u oblasti anode korišćeni drugi bakterijski sojevi (Tandukar *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011). Na ovaj način se postiže redukcija Cr samo u katodnoj komori. U ovom istraživanju prvi put su isti bakterijski sojevi uspešno korišćeni i za redukciju Cr(VI) i za produkciju struje, dok je gotovo potpuna redukcija Cr postignuta u obe komore gorivne ćelije.

## Zaključak

U ovom istraživanju konstruisane su gorivne ćelije u kojima su producenti struje ujedno redukovali Cr(VI), čime je postignuta gotovo potpuna redukcija Cr i u anodnoj i u katodnoj komori. Ovakve gorivne ćelije mogle bi se koristiti kao protočni sistem za prečišćavanje otpadnih voda, gde bi električna energija za pokretanje sistema bila poreklom iz same gorivne ćelije.

Kod različitih bakterijskih sojeva uočen je različit odnos efikasnosti redukcije Cr u oblasti katode i u oblasti anode. Kod sojeva *Pseudomonas sp.*, *B. stearothermophilus* i *S. plymuthica* u aerobnoj ćeliji redukcija je bila efikasnija u oblasti anode. U anaerobnoj ćeliji veća efikasnost redukcije postignuta je u katodnoj komori, no dati odnosi se ne održavaju tokom čitavog inkubacionog perioda. Ovakav odnos efikasnosti redukcija katode i anode ukazuje da O<sub>2</sub> kao dodatni akceptor elektrona inhibira redukciju Cr u katodnoj komori.

Zaključeno je i da je prisustvo Cr(VI) kod svih ispitivanih sojeva neophodno za produkciju struje, jer

u grupama bez dodatka  $K_2Cr_2O_7$  nije detektovana struja.

Pad intenziteta struje u gorivnim ćelijama praćen je porastom unutrašnjeg otpora, što bi se moglo sprečiti korišćenjem medijuma koji sadrži samo jedan izvor ugljenika ili korišćenjem jonoizmenjivačkih membrana umesto agaroznih slanah mostova. Ovo predložimo kao korekciju modela gorivnih ćelija koje će se koristiti u budućim istraživanjima.

## Literatura

- Conceicao D. P., Tavares dos Passos C., Jacques R. J. S., Bento F. M., Simonetti A. B., Camargo F. A. O. 2009. A Novel Chromate Reductase from *Bacillus* sp. ES29: Characterization and Partial Purification. *Revista Ciencias Exatas e Naturais*, **11** (2).
- Chaudhuri S. K., Lovley D. R. 2007. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature biotechnology*, **21** (10): 1229.
- Chaturvedi M. K. 2011. Studies on chromate removal by chromium-resistant *Bacillus* sp. isolated from tannery effluent. *Journal of environmental protection*, **2**(1): 76-82.
- Garbisu C., Alkorta I., Llama M. J., Serra J. L. 1998. Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation*, **9**: 133.
- Holmes D. E., Chaudhuri K. S., Nevin K. P., Mehta T., Methé B. A., Liu A., Ward J. E., Woodard T. L., Webster J., Lovley D. R. 2006. Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Microbiology*, **8** (10): 1805.
- Huang L., Chai X., Chen G., Logan B. E. 2011. Effect of set potential on hexavalent chromium reduction and electricity generation from biocathode microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.*, **45**: 5025.
- Huang L., Chen J., Quan X., Yang F. 2010. Enhancement of hexavalent chromium reduction and electricity production from a biocathode microbial fuel cell. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **33**: 937.
- Ishibashi Y., Cervantes C., Silver S. 1990. Chromium Reduction in *Pseudomonas putida*. *Applied and environmental microbiology*, **56** (7): 2268.
- Knežević V. J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji – prvi deo*. Beograd: Biološki fakultet
- 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).
- 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. *Appl Microbiol Biotechnol*, **77**: 551.
- Lovley D. R. 2006. Microbial Energizers: Fuel Cells That Keep on Going. *Microbe*, **1** (7): 323.
- Mondaca M. A., Campos V, Moraqa R., Zaror C. A. (2002). Chromate reduction in *Serratia marcescens* isolated from tannery effluent and potential application for bioremediation of chromate pollution. *Scientific World Journal*, **9** (2): 972.
- Meyer M., Roy V., Bentley W., Ghodssi R. 2011. Development and validation of a microfluidic reactor for biofilm monitoring via optical methods. *J. Micromech. Microeng.*, **21**.
- Nimje V. R., Chen C. Y., Chen C. C., Chen R. H, Tseng M. J., Jean J. S., Chang Y. F. 2011. Glycerol degradation in single-chamber microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, **102**: 2629.
- Raičević V, Golić Z, Lalević B., Jovanović L, Kiković D, Antić-Mladenović S. 2010. Isolation of chromium resistant bacteria from a former bauxite mine area and their capacity for Cr-(VI) reduction. *African Journal of Biotechnology*, **9** (40): 6727.
- Silver S., Phung L. T. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*, **32**: 587.
- Tandukar M, Huber S. J., Onodera T, Pavlostathis S. 2009. Biological Chromium(VI) Reduction in the Cathode of a Microbial Fuel Cell. *Environmental Science and Technology*, **43**: 8159.
- Ur Rahman M., Gul S., Ul Haq M. Z. 2007. Reduction of Chromium(VI) by Locally Isolated *Pseudomonas* sp. C-171. *Turkish Journal of Biology*, **31**: 161.
- Xu W. H., Liu Y. G, Zeng G. M, Li X., Song H. X., Peng Q. Q. 2009. Characterization of Cr-(VI) resistance and reduction by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, **19**: 1336.



## Cr-(VI) Reduction and Power Generation in Aerobic and Anaerobic Two-Chambered Microbial Fuel Cells

Chromium (Cr) is highly toxic in its hexavalent state, while its trivalent form has less prominent toxic effects. Remediation of ecosystems polluted with Cr-(VI) is based on its reduction in the trivalent state, for which microbial activity could be used. In this research it was shown that bacterial strains which reduce Cr-(VI) (*Pseudomonas* sp, *Bacillus stearothermophilus*, *Serratia plymuthica* and *Serratia fonticola*) could lead to current generation in microbial fuel cells (MFC). In these fuel cells the investigated strains were inoculated in the anode chamber, where microbial activity lead to current generation followed by Cr-(VI) reduction. In this way power generation and chromium reduction were integrated in the same MFC. For each strain two types of MFC were generated – an anaerobic cathode chamber and an aerobic cathode chamber type. Time change of

current intensity, voltage, internal resistance, microbial growth and Cr-(VI) concentration were followed. In anaerobic and aerobic cells a different reduction ratio was obtained in the cathode and anode chambers, where oxygen presence inhibited chromium reduction in the cathode area. Chromium concentration decrease induced the inhibition of its reduction, which was followed with the decrease in current intensity. In total absence of chromium no power was generated. The explanation for this phenomenon is that chromium reduction and power generation in the investigated strains were obtained by the same bacterial reductases, where chromium presence in the environment is needed for the expression of these reductases. Given that with the same enzyme bacteria transport electrons on the anode or on the Cr-(VI), the strain which expressed the highest chromium reduction efficiency (*Serratia plymuthica*) produced power with the lowest efficiency. On the other side, the strain which reduced chromium with the lowest efficiency (*Pseudomonas* sp.) was most efficient in power generation. The described fuel cell model could find application as a flow system for waste water treatment, where electricity for running the system could be generated in the fuel cell. 