

УДК 644.63

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ МЕЖДУ АНОДНЫМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ КОНСОРЦИУМОМ И АНОДОМ КАК КЛЮЧЕВЫХ ФАКТОРОВ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА

Жигула Е.А.¹, Петухов В.И.¹, Жигула Л.Д.¹

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия (Приморский край, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), e-mail: ktwalker17@gmail.com

Предлагается характеристика основных процессов переноса электронов от микробной биопленки к аноду, а также факторов, влияющих на эти процессы. На сегодняшний день существует три основных способа переноса электронов: посредством окислительно-восстановительного мобильного медиатора-шаттла, через проводящие и посредством особого мембранносвязанного комплекса. В статье представлена характеристика каждого способа, а также обзор ведущихся на сегодняшний день исследований в данной области. Авторы анализируют проблему использования различных способов электронного переноса для разных слоев толщи анодной биопленки и выделяют наиболее перспективные направления для исследования области электрохимического взаимодействия микробиологического консорциума с анодом. Представлен краткий обзор исследований в области выведения такого бактериального штамма, который позволит МТЭ вырабатывать больше электроэнергии без добавления новых дорогостоящих катализаторов или электронных шаттлов.

Ключевые слова: микробный топливный элемент, перенос электрона, биопленка, нанопровода, цитохромы, электрохимическое взаимодействие, анод.

CHARACTERISTICS OF ELECTRON TRANSFER PROCESSES BETWEEN THE ANODE AND THE ANODE MICROBIAL CONSORTIUM AS A KEY FACTOR IN THE PERFORMANCE OF MICROBIAL FUEL CELL

Zhigula E.A.¹, Petukhov V.I.¹, Zhigula L.D.¹

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia (Primorsky region, Vladivostok, Sukhanova st, 8), e-mail: ktwalker17@gmail.com

The following article characterizes the main processes of electron transfer from the anode associated biofilm to the anode and factors that might influence these processes. At the present day three main pathways for electron transfer have been identified and include: direct membrane bound complex mediated electron transfer, mobile redox shuttle mediated electron transfer and electron transfer through conductive pili, so called nanowires. The work includes the characteristics of every pathway and the brief review of the recent research in this sphere. Authors characterize the problem of using different ways of electron transfer for different layers of the anode associated biofilm and define the highlight for the perspectives of the future research of the electrochemical interactions between microbial consortium and the anode. The article also provides the brief review of the research in the sphere of producing a strain that would let the MFC produce more electricity without addition of high cost catalysts or mediating shuttles.

Keywords: microbial fuel cell, electron transfer, biofilm, nanowires, cytochromes, electrochemical interaction, anode.

Использование бактерий для производства электроэнергии представляет собой новое направление в биоэнергетике. Микробные топливные элементы (МТЭ) представляют собой биоэлектрохимическую систему, работа которой основана на способности бактерий к разложению таких веществ, как глюкоза, ацетат, бутират или сточные воды. Благодаря их окислению высвобождаются электроны, которые передаются на анод, после чего по проводнику выработанный электрический ток поступает к катоду (рис. 1).

Идея использования микробных клеток в попытке производства электроэнергии была выдвинута М.С. Поттером еще в 1911 г. Эта технология долгое время не вызывала интереса ученых по причине своей крайне низкой производительности. Современная концепция устройства МТЭ была предложена лишь в 1977 году. Новое решение позволило повысить количество производимой реактором электроэнергии. С этого времени начинается процесс активного поиска оптимальных технических решений для эффективной работы МТЭ.

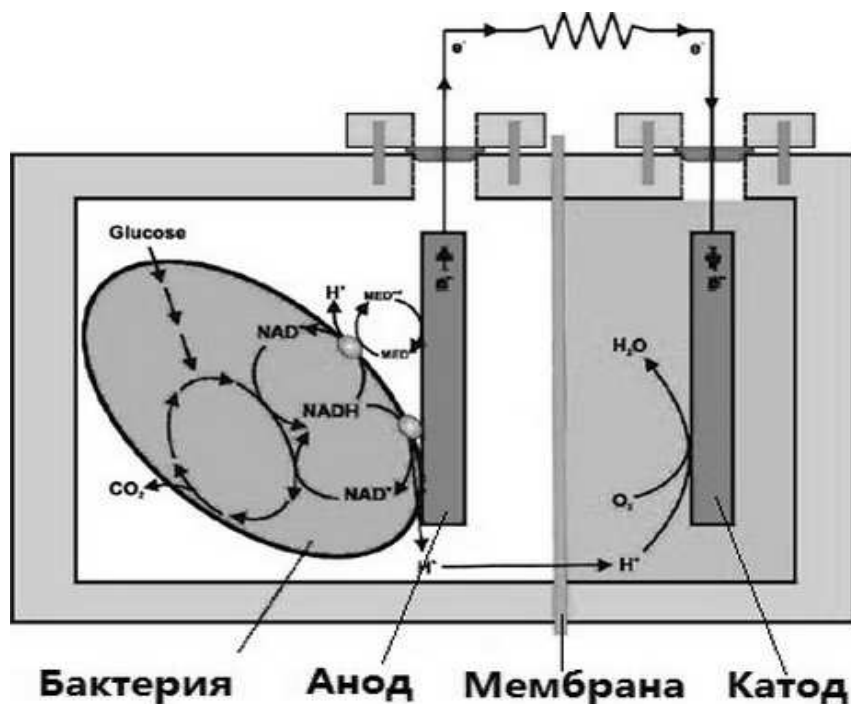


Рис. 1. Схема работы двухкамерного микробного топливного элемента.

Основная задача, стоящая перед исследователями, заключается в повышении количества производимой МТЭ электроэнергии при сокращении материальных затрат на поддержание работоспособности реактора. В ходе решения этой задачи возникает вопрос, какая бактериальная культура позволит МТЭ работать с наивысшей эффективностью. К настоящему моменту описано около десяти тысяч видов бактерий и предполагается, что их существует свыше миллиона, однако не все из них подходят для использования в работе микробных топливных элементов. Критерием отбора в данном случае будет являться способность бактерий разлагать органические вещества и передавать электроны из внутриклеточного пространства на анод. Для бактерий, используемых в работе МТЭ, характерно образование своеобразной биопленки, покрывающей электрод, таким образом, бактериальные клетки расположены на нем в несколько слоев и не все микроорганизмы находятся в непосредственном контакте с анодом. Процессы электрохимического взаимодействия разных слоев биопленки с анодом вызывают интерес многих исследователей в силу того, что эти процессы во многом определяют производительность МТЭ. Изучение

прямого и косвенного электронного переноса от бактериальной клетки к аноду и факторов, влияющих на интенсивность этого процесса, может внести существенный вклад в проблему выведения бактериальной культуры, оптимальной для эффективной работы микробных топливных элементов.

Целью данной статьи является краткая характеристика электрохимических взаимодействий смешанных или чистых микробиологических культур, связанных с анодом, в том числе рассмотрение процессов переноса электронов в различных слоях анодной биопленки, поскольку интерпретация этих процессов является одним из ключевых факторов в решении проблемы повышения производительности МТЭ. Также рассматриваются факторы внутреннего строения бактериальной клетки, как потенциально влияющие на интенсивность электрохимического взаимодействия между анодом и биопленкой и, таким образом, влияющие на количество энергии, производимой бактериями в процессе работы микробного топливного элемента.

Характер этого взаимодействия может варьироваться в зависимости от стадии развития биопленки, состава микробного сообщества и количества производимой этой биопленкой электрической энергии [5; 7; 25; 26; 31; 34].

Механизмы прямого и косвенного электронного переноса были выявлены при исследовании металловосстанавливающих бактерий, которые используют нерастворимые оксиды железа в качестве конечного акцептора электронов [21; 26; 29]. Три основных известных способа переноса электронов (рис. 2) представляют собой:

- 1) перенос электронов посредством окислительно-восстановительного мобильного медиатора-шаттла [25; 26];
- 2) перенос электронов через проводящие фимбрии (так называемые нанопровода) [9];
- 3) прямой перенос электронов посредством особого мембранносвязанного комплекса [1].

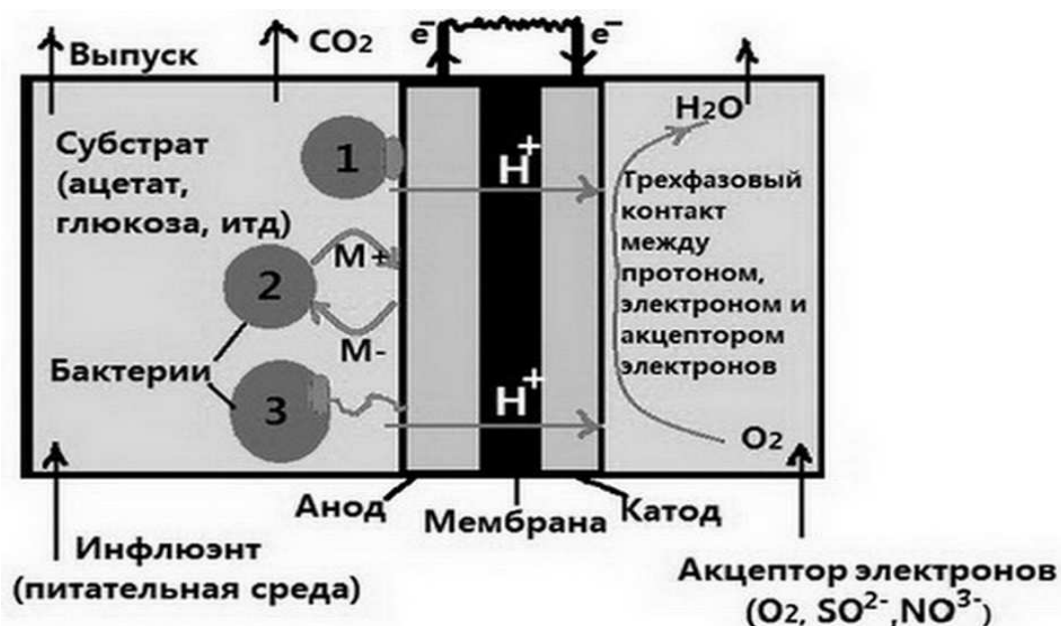


Рис. 2. Упрощенный вид двухкамерного микробного топливного элемента с возможными режимами переноса электронов: 1 - прямой перенос электронов (через внешние мембранные цитохромы); 2 - перенос электронов через шаттлы-посредники; 3 - перенос электронов через нанопровода.

В ранних исследованиях в МТЭ обычно добавлялись химические медиаторы или электронные шаттлы, в результате чего способность к переносу электронов обретали новые виды бактерий, для которых эта способность была не характерна. Эти растворимые экзогенные медиаторы, способствующие переносу электрона из клетки на электрод, включают, например, нейтральрот, антрахинон-2-6, дисульфат (AQDS), тионин, феррицианид калия, метилвиологен и др. [2; 18; 23; 27]. Экзогенные электронные шаттлы, как правило, стабильны в окисленной и восстановленной форме, они не разлагаются и не являются токсичными. Однако работа МТЭ рассчитана на срок не менее полугода, и для таких временных рамок экзогенные химические медиаторы не применимы в силу того, что они могут ингибировать бактериальную культуру. К тому же их высокая стоимость и необходимость регулярно добавлять их в питательный раствор анодной камеры делают технологию МТЭ для очистки сточных вод и производства электроэнергии экономически не выгодной [10].

В то же время было доказано [25; 27], что необходимые для работы реактора-МТЭ медиаторы-шаттлы могут быть не только экзогенными, поскольку существуют бактерии, которые могут производить эндогенные химические медиаторы. Например, пиоцианин производится бактериями вида *Pseudomonas aeruginosa* и также может переносить электроны из клетки на электрод и участвовать в процессе производства электроэнергии в МТЭ. Смешанная бактериальная культура, в составе которой присутствует *P. aeruginosa*,

может производить высокие концентрации медиаторов при низком внутреннем сопротивлении в МТЭ. Это достигается использованием феррицианида в качестве католита (вместо кислорода), в результате чего производительность МТЭ возрастает до 4,2 Вт/м². Эти результаты свидетельствуют о возможности функционирования крупномасштабного МТЭ без добавления экзогенного медиатора.

Перенос электронов из бактериальной клетки к аноду возможен не только посредством экзогенных или эндогенных медиаторов-шаттлов. Некоторые виды бактерий, например *Geobacter* и *Shewanella*, способны сами производить проводящие фимбрии (пилусы), которые выступают в роли биологических нанопроводов для передачи электронов от бактериальной клеточной поверхности к акцептору [9]. Исследования структуры нанопроводов выявили существенные различия в их структуре. Пилусы *Geobacter sulfurreducens* выглядят как относительно тонкие нити (рис. 3), в то время как нанопровода *Shewanella oneidensis* имеют вид толстых «кабелей», которые потенциально могут состоять из нескольких токопроводящих нитей, сгруппированных вместе, и обладать более высокими проводящими способностями [29].

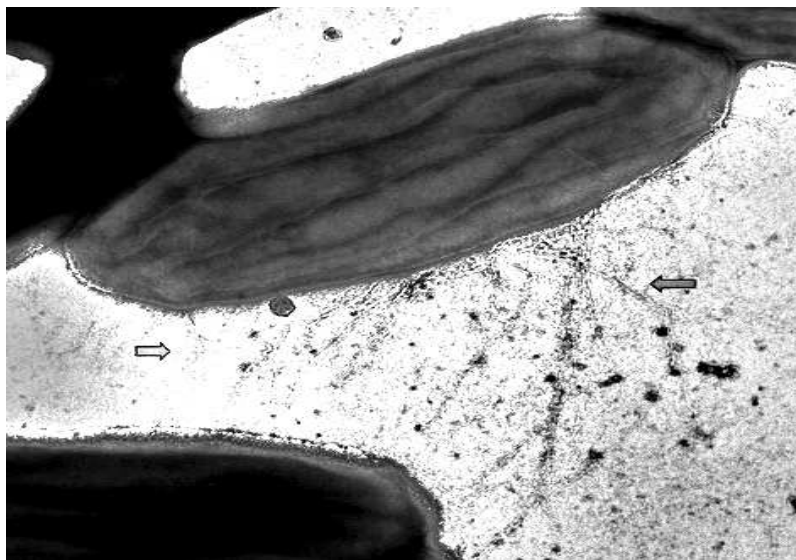


Рис. 3. Бактерия вида *Geobacter sulfurreducens*. Стрелки на фото указывают на пилусы-нанопровода.

Помимо железовосстанавливающих бактерий, существуют и другие организмы, которые способны производить электропроводные нанопровода. Этим качеством обладают фототрофные, кислородные цианобактерии (*Synechocystis*), которые также могут служить для производства электроэнергии МТЭ, но только в светлое время суток [10].

В процессе работы мембраносвязанного комплекса микроорганизм производит окислительно-восстановительный фермент, который остается неподвижным и располагается на клеточной стенке. Когда бактерии покрывающей электрод биопленки разлагают органический субстрат, окислительно-восстановительные ферменты клеточной стенки

обеспечивают прямую передачу электронов. Примерами таких бактерий служат *Geobacter sulfurreducens*, *Rhodospirillum rubrum*, *Geobacter metallireducens* и *Aeromonas hydrophila* [1; 4; 32].

Генетические исследования и электрохимический анализ показывают, что клетки, находящиеся в прямом контакте с анодом в МТЭ, взаимодействуют с ним через цитохром С, находящийся на внешней поверхности клетки [3; 13; 14; 17]. Между тем *G. sulfurreducens* может образовывать биопленки толщиной более 50 мкм, при этом все клетки в толще биопленки являются метаболически активными и вносят вклад в производство электроэнергии, разлагая органические вещества и передавая электроны на анод [3; 8; 22]. Исследователи считают, что производство микробных нанопроводов имеет важное значение для дальнего переноса электронов через толщу биопленки *G. sulfurreducens* (рис. 4) [30]. Предполагается, что производство электроэнергии толщей анодной биопленки возможно только в том случае, если вся толща является электропроводной [16; 20; 24]. Это явление само по себе необычно, поскольку считается, что большинство видов бактерий работает как изоляторы, а не проводники [6; 12]. Настоящим прорывом в этой области станет измерение электропроводности биопленки и определение компонентов, отвечающих за это свойство, а также факторов, оказывающих на него влияние.



Рис. 4. В биопленке *Geobacter sulfurreducens* клетки, непосредственно контактирующие с электродом, передают электроны посредством цитохром, в то время как клетки, удаленные от электрода, могут использовать сеть нанопроводов.

Многочисленные исследования последних лет направлены на выведение такого бактериального штамма, который позволит МТЭ вырабатывать больше электроэнергии без добавления новых дорогостоящих катализаторов или электронных шаттлов [15]. Предпринимались попытки повысить производство электроэнергии в МТЭ путем создания штамма *Geobacter* с более интенсивным процессом метаболизма [19]. Дополнительное

производство цитохромов или микробных нанопроводов не привело к увеличению мощности производства, равно как и создание потока АТФ (аденозинтрифосфат), по прогнозу метаболической модели ведущее к повышению метаболизма клетки. Адаптивная селекция в МТЭ имела больше успеха, увенчавшись производством штамма *G. Sulfurreducens*, названного KN400, который способен на 8-кратное увеличение удельной мощности. Интересно, что этот штамм производит более тонкую биопленку с меньшим количеством внешних цитохромов, но с обилием нанопроводов, что дает почву для новых исследований сложного процесса переноса электрона при высоких плотностях тока [33].

Таким образом, можно сказать, что один развитый бактериальный консорциум анодной биопленки может использовать одновременно разные способы переноса электронов на анод для разных слоев толщи биопленки. Более того, анализ характеристик способов переноса от бактериальной клетки к аноду позволяет сказать, что для эффективной работы МТЭ должен применяться не один способ переноса электрона, а оптимальная для данных условий комбинация способов. Наблюдения за работой МТЭ с участием различных искусственно выведенных штаммов бактерий показывают, что производство электроэнергии бактериями МТЭ является комплексным процессом, и для увеличения его масштабов требуется больше, чем изменения в нескольких генах или изменения интенсивности метаболизма бактериальной клетки. Несомненно, вопрос поиска оптимального бактериального штамма для более эффективной работы МТЭ с минимальными материальными затратами еще не решен и потребует более детальных исследований того, какие именно факторы и условия среды оказывают наибольшее влияние на производительность микроорганизмов в МТЭ.

Список литературы

1. Bond D.R. and Lovley D.R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. - Vol. 69, № 3. - P. 548-1555.
2. Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M. and Lovley D.R. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments // *Science*. - 2002. - Vol. 295, № 5554. - P. 483-485.
3. Busalmen J.P., Esteve-Nunez A., Berna A., Feliu J.M. C-type cytochromes wire electricity-producing bacteria to electrodes // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2008. - № 47. - P. 4874–4877.
4. Chaudhuri S.K. and Lovley D.R. Electricity Generation by Direct Oxidation of Glucose in Mediatorless Microbial Fuel Cells // *Nat. Biotechnol.* - 2003. - Vol. 21. - P. 1229-1232.
5. Delaney G.M., Bennetto H.P., Mason J.R., Roller S.D., Stirling J.L. and Thurston C.F. Electron-transfer coupling in microbial fuel-cells 2. Performance of fuel-cells containing selected

- microorganism mediator substrate combinations // J. Chem. Technol. Biotechnol. B- Biotechnology – 1984. - Vol. 34, №1. - P. 13-27.
6. Dheilly A., Linossier I., Darchen A., Hadjiev D., Corbel C., Alonso V. Monitoring of microbial adhesion and biofilm growth using electrochemical impedancemetry // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. - Vol. 79. - P. 157–164.
 7. Fricke K., Harnisch F., Schroder U. On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells // Energ. Environ. Sci. – 2008. - № 1. - P. 144–147.
 8. Franks A.E., Nevin K.P., Jia H., Izallalen M., Woodard T.L., Lovley D.R. Novel strategy for three-dimensional real-time imaging of microbial fuel cell communities: monitoring the inhibitory effects of proton accumulation within the anode biofilm // Energ. Environ. Sci. – 2009. - № 2. - P. 113–119.
 9. Gorby Y.A. and Beveridge T.J. Composition, reactivity, and regulation of extracellular metal-reducing structures (nanowires) produced by dissimilatory metal reducing bacteria // Presented at DOE/NABIR meeting - April 20, 2005. - Warrenton, VA.
 10. Gil G.C., Chang I.S., Kim B.H., Kim M., Jang J.K., Park H.S. and Kim H.J. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell // Biosensors and Bioelectronics. - 2003. - Vol. 18b, № 4. - P. 327-334.
 11. Gorby Y.A [et al.] Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2006. - Vol. 103, № 30. - P. 11358-11363.
 12. Herbert-Guillou D., Tribollet B., Festy D., KiÈnÈ L. In situ detection and characterization of biofilm in waters by electrochemical methods // Electrochimica Acta – 1999. - Vol. 45. - P. 1067–1075.
 13. Holmes D.E.; Chaudhuri S.K.; Nevin K.P.; Mehta T.; Methe B.A.; Liu A.; Ward J.E.; Woodard T.L.; Webster J.; Lovley D.R. Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens* // Env. Microbiol. – 2006. - № 8. - P. 1805–1815.
 14. Holmes D.E.; Mester T.; O'Neil R.A.; Perpetua L.A.; Larrahondo M.J.; Glaven R.; Sharma M.L.; Ward J.E.; Nevin K.P.; Lovley D.R. Genes for two multicopper proteins required for Fe(III) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens* have different expression patterns both in the subsurface and on energy-harvesting electrodes // Microbiol. – 2008. - Vol. 154. - P. 1422–1435.
 15. Izallalen M.; Mahadevan R.; Burgard A.; Postier B.; Didonato Jr. R.; Sun J.; Schilling C.H.; Lovley D.R. *Geobacter sulfurreducens* strain engineered for increased rates of respiration // Met. Eng. – 2008. - №10. - P. 267–275.
 16. Kato-Marcus A.; Torres C.I.; Rittmann B.E. Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell // Biotechnol. Bioeng. – 2007. - Vol. 98. - P. 1171–1182.

17. Kim B.C.; Leang C.; Ding Y.H.; Glaven R.H.; Coppi M.V.; Lovley D.R. OmcF, a putative c-Type monoheme outer membrane cytochrome required for the expression of other outer membrane cytochromes in *Geobacter sulfurreducens* // *J. Bacteriol.* - 2005. - Vol. 187. - P. 4505–4513.
18. Logan B.E. Extracting hydrogen electricity from renewable resources // *Environ. Sci. Technol.* - 2004. - Vol. 38, № 9. - P. 160-167.
19. Mahadevan R.; Bond D.R.; Butler J.E.; Esteve-Nunez A.; Coppi M.V.; Palsson B.O.; Schilling C.H.; Lovley D.R. Characterization of metabolism in the Fe(III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. - Vol. 72. - P. 1558–1568.
20. Muñoz-Berbel X.; Muñoz F.J.; Vigués N.; Mas J. On-chip impedance measurements to monitor biofilm formation in the drinking water distribution network // *Sensor Actuat. B: Chem.* – 2006. - Vol. 118. - P. 129–134.
21. Myers C.R.; Myers J.M. Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Bacteriol.* – 1992. - Vol. 174. – P. 3429–3438.
22. Nevin K.P.; Richter H.; Covalla S.F.; Johnson J.P.; Woodard T.L.; Orloff A.L.; Jia H.; Zhang M.; Lovley D.R. Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells // *Environ. Microbiol.* – 2008. - № 10. - P. 2505–2514.
23. Park D.H.; Zeikus J.G. Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation // *J. Bacteriol.* - 1999. - Vol. 181. - P. 2403-2410.
24. Picioreanu C.; Head I.M.; Katuri K.P.; van Loosdrecht M.C.; Scott K.A computational model for biofilm-based microbial fuel cells // *Water Res.* – 2007. - Vol. 41. - P. 2921–2940.
25. Rabaey K.; Boon N.; Siciliano S.D.; Verhaege M.; Verstraete W. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2004. - № 70. - P. 5373–5382.
26. Rabaey K., Boon N., Hofte M. and Verstraete W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells // *Environmental Science and Technology.* – 2005. - Vol. 39, № 9. – P. 3401-3408.
27. Rabaey K. and Verstraete W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation // *Trends Biotechnol.* - 2005. - Vol. 23b. - № 6. - P. 291–298.
28. Rabaey K., Ossieur W., Verhaege M. and Verstraete W. Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity // *Water Science and Technology.* - 2005. - Vol. 52, № 1-2. - P. 515-523.

29. Reguera G.; McCarthy K.D.; Mehta T.; Nicoll J.S.; Tuominen M.T.; Lovley D.R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires // *Nature*. – 2005. - Vol. 435. - P. 1098–1101.
30. Reguera G.; Nevin K.P.; Nicoll J.S.; Covalla S.F.; Woodard T.L.; Lovley D.R. Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2006. - Vol. 72. - P. 7345–7348.
31. Richter H.; Nevin K.P.; Jia H.F.; Lowy D.A.; Lovley D.R.; Tender L.M. Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer // *Energ. Environ. Sci.* – 2009. - № 2. - P. 506–516.
32. Vandevivere P. and Verstraete W. Environmental applications in Basic biotechnology, edited by Ratledge C. and Kristiansen B. - Cambridge University Press, 2001. – P. 531–557.
33. Yi H.; Nevin K.P.; Kim B.C.; Franks A.E.; Klimes A.; Tender L.M.; Lovley D.R. Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells // *Biosens. Bioelectron.* - 2009. - № 24. - P. 3498–3503.
34. Zhang T.; Cui C.; Chen S.; Ai X.; Yang H.; Shen P.; Peng Z. // *Chem. Commun. Camb.* - 2006. – P. 2257–2259.

Рецензенты:

Гончарук В.К., д.х.н., профессор, заведующий лабораторией оптических материалов, Институт химии ДВО РАН, г.Владивосток.

Алексейко Л.Н., д.х.н., профессор, ЗАО «Дальневосточный НИИ охраны природы», г.Владивосток.