



Mikrobiális üzemanyagcella teljesítményének növelése

Doktori értekezés

SZÖLLŐSI ATTILA

Témavezető: Dr. Nguyen Duc Quang
egyetemi tanár

Budapest
2015

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Felföldi József**
egyetemi tanár, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Fizika-Automatika Tanszék

Témavezető: **Dr. Nguyen Duc Quang**
egyetemi tanár, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Sör- és Szeszípari Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2015. október 13-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Maráz Anna, DSc

Tagjai

Biacs Péter, DSc

Adányiné Kisbocskói Nóra, DSc

Kovács Mónika, PhD

Dobolyi Csaba, CSc

Opponensek

Beczner Judit, CSc

Gubicza László, DSc

Titkár

Nagy Edina Szandra, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	1
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1 Üzemanyagcella típusok és csoportosításuk.....	7
2.1.1 Kémiai üzemanyagcellák.....	8
2.1.2 Mikrobiális üzemanyagcella.....	10
2.2 Mikrobiális üzemanyagcella kialakítások.....	11
2.3 Mikrobiális üzemanyagcella elektród kialakítások.....	16
2.3.1 Anód kialakítások és fejlesztési lehetőségek.....	16
2.3.1.1 MÜC anód anyagok.....	18
2.3.1.2 Anódok fizikai és kémiai felületkezelése.....	19
2.3.1.3 Nanotechnológiai és nanokompozit anódkialakítások.....	20
2.3.2 Katód kialakítások és fejlesztési lehetőségek.....	21
2.3.2.1 MÜC katód anyagok.....	22
2.3.2.2 Katód katalizátorok.....	23
2.3.3 A mikrobiális üzemanyagcella teljesítménye.....	25
2.4 A mikrobiális üzemanyagcella mikrobiológiája.....	27
2.4.1 Extracelluláris elektronokat termelő anyagcsere folyamatok.....	27
2.4.2 Az elektrontranszfer módjai.....	30
2.5 Biofilm képzés a mikrobiális üzemanyagcellában.....	31
2.6 Mikrobiális üzemanyagcellában alkalmazott mikrobák.....	32
2.7 Mikroba-szelektáló módszerek MÜC alkalmazásra.....	36
2.8 A mikrobiális üzemanyagcella alkalmazási lehetőségei.....	38
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	41
4.1 Felhasznált mikroorganizmusok.....	41
4.2 Alkalmazott tápközegek.....	41
4.3 Vizsgálatok, módszerek.....	44
4.3.1 Szaporodás kinetikai vizsgálatok.....	44
4.3.2 Szubsztrátum hasznosítási vizsgálatok.....	45
4.3.3 Mikrobiális vas(III)-redukció vizsgálata.....	45
4.3.4 Extracelluláris elektron-közvetítő képzés vizsgálata.....	46
4.3.5 Mikrobák tapadásának vizsgálata.....	46
4.3.6 Vezetőképes gél-anód létrehozása.....	47
4.3.7 Nikkel bevonatú katód létrehozása.....	48
4.4 Mikrobiális üzemanyagcella összeállításai.....	48
4.4.1 Két-kamrás mikrobiális üzemanyagcella.....	48
4.4.2 Egykamrás szakaszos üzemű üzemanyagcella.....	49
4.5 Analitikai módszerek.....	50
4.5.1 Riboflavin tartalom meghatározása.....	50
4.5.2 Fehérjetartalom mérése.....	50
4.5.3 Fehérjék vezetőképességének meghatározása.....	50
4.5.4 Elektromos paraméterek meghatározása.....	51
4.6 Statisztikai vizsgálatok.....	52
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	55

6.1	Mikrobák alkalmazhatósági vizsgálata mikrobiális üzemanyagcella bio-katalizátoraként	55
6.1.1	Gyors szelektálási módszer a mikrobiális Fe^{3+} -redukció alapján	55
6.1.1.1	Módszer fejlesztés	55
6.1.1.2	Néhány mikroorganizmus vas(III)-redukciós tulajdonsága	58
6.1.1.3	Az áramerősség és az elektromos kapacitás kapcsolata a mikrobás vas(III)-redukcióval	60
6.2	Mikroorganizmusok elektrogén profiljának meghatározása	65
6.2.1	<i>Geobacter toluenoxydans</i> elektrogén profiljának meghatározása	65
6.2.1.1	Szaporodás-kinetikai vizsgálat	65
6.2.1.2	Fe^{3+} -redukciós képesség vizsgálata	68
6.2.1.3	Szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságok kapcsolata	71
6.2.2	<i>Shewanella xiamenensis</i> elektrogén profiljának meghatározása	72
6.2.2.1	Szubsztrátumok hatása az extracelluláris elektrontermelésére	72
6.2.2.2	Szaporodás-kinetikai vizsgálat	74
6.2.2.3	Fe^{3+} -redukciós képesség vizsgálata	75
6.2.2.4	Szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságok kapcsolata	78
6.2.3	Extracelluláris elektron közvetítő képzés vizsgálata	79
6.2.3.1	Fehérje természetű elektron-közvetítő termelés	79
6.2.3.2	Riboflavin termelés és hatás a MÜC teljesítményére	80
6.2.3.3	Tapadási tulajdonságok vizsgálata	82
6.3	Elektródok fejlesztése a MÜC teljesítményének növelésére	83
6.3.1	Elektromosan vezetőképes gél-anód létrehozása	83
6.3.1.1	A gél-elektródok vezetőképességének növelése	83
6.3.1.2	Különböző összetételű gél-elektródokkal létrehozott, szakaszos üzemű MÜC-rendszerek vizsgálata	85
6.3.1.3	Gél-elektródokkal létrehozott fél-folytonos üzemű MÜC rendszer vizsgálata	87
6.3.1.4	Gél-elektróddal létrehozott folytonos üzemű MÜC rendszer vizsgálata	88
6.3.2	Katód fejlesztés - MÜC rendszer nikkell katalizátorral a katód oldalon	89
6.4	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	92
7.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	95
8.	ÖSSZEFOGLALÁS	97
9.	SUMMARY	103
10.	IRODALOMJEGYZÉK	109
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	121

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CNT: Carbon Nanotube- szén nanocső

MFC: Microbial Fuel Cell – mikrobiális üzemanyagcella

PAFC: Phosphoric Acid Fuel Cell – foszforsav üzemanyagcella

SOFC: Solid Oxide Fuel Cell – szilárd oxid üzemanyagcella

PEMFC: Proton Exchange Membrane Fuel Cell – proton szelektív membrán üzemanyagcella

DMFC: Direct Methanol Fuel Cell – direkt metanol üzemanyagcella

PEM: Proton Exchange Membrane – proton szelektív membrán

MÜC: Mikrobiális Üzemanyagcella

MCFC: Molten Carbonate Fuel Cell – olvadt karbonát üzemanyagcella

Foto-MÜC: fotoszintetikus mikrobiális üzemanyagcella

OD: Optikai Denzitás

PANI: Polianilin

MSE: Mean Square Error – átlagos négyzetes eltérés

RMSE: Root Mean Square Error – átlagos négyzetes eltérés gyöke

DW: Durbin-Watson

TKE: Telepképző Egység

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A világ népességének növekedése és ezzel egyidejűleg az emberi szükségletek változása egyre nagyobb terhet ró több iparágazatra, elsősorban a mezőgazdaságra, az élelmiszeriparra, ipari és kommunális szennyvízkezelésre, valamint az energia szektorra. További problémát jelentenek a nagymértékű fosszilis energiafogyasztásból származó környezetszennyezés és klímaváltozás által okozott károk, valamint a javak egyenlőtlen eloszlása miatt felgyülemlett számos társadalmi, politikai, gazdasági és vallási feszültségek. A problémák kezelésére, eliminálására és a fenntartható életminőség biztosításának érdekében globális és rendszerszintű gondolkodás, valamint stratégiai előrelépések szükségesek, amelyek nem jöhetnek létre az intenzív tudományos és technológiai háttérismeretek bővülése nélkül.

Pozitív jelként mutatkozik, hogy világszerte számos kormány felismerte és intenzíven be is kapcsolódott a megoldások keresésébe különböző átfogó programok indításával. A megvalósítás során előtérbe kerültek azok a szén-dioxid kibocsátás szempontjából semleges technológiák, amelyek általában a biomassza hasznosításon alapulnak. Ilyen lehet az ipari melléktermékekből történő elektromos és hőenergia, vagy a lignocellulóz alapú bioetanol előállítása, a biomassza gázosítása vagy a biogáztermelés technológiája.

A fenntartható fejlődés érdekében elengedhetetlen a különböző ipari és kommunális szennyvizek megfelelő kezelése. A szennyvíztisztítási technológiák egyre nagyobb hatékonysággal működnek. A legtöbb technológia azonban még mindig energia és erőforrás igényes, ami jelentős költségeket von maga után és gátja lehet alkalmazásuknak. Ezekhez a kutatásokhoz tartozik a mikrobiális üzemanyagcellák fejlesztése is, amely hozzájárulhat a városok megnövekedett szennyvíz és szerves hulladék ártalmatlanításához, kezeléséhez. A konvencionális szennyvíztisztítási technológiákhoz hasonlóan a mikrobiális üzemanyagcellákban lévő mikrobák lebontják a szerves anyagokat és ezzel csökkentik a szennyvízkibocsátás káros hatásait. A mikrobiális üzemanyagcellában a mikroorganizmusok az anyagcseréjük során nem csupán szén-dioxidot és biomasszát termelnek, hanem képesek közvetlenül elektromos áramot is létrehozni. A fejlesztett elektromos áramot ezután tetszés szerint felhasználhatják egyenáramú gépek üzemeltetésére vagy fejlettebb infrastruktúra esetében (átalakítók, tárolók, stb.) váltóáramot hozhatnak létre, ami akár az elektromos hálózatba is táplálható. Természetesen az üzemanyagcellák alkalmazását nem korlátozhatjuk csupán a szennyvíztisztításra, számos más területen is használhatók, mint például a fejlett infrastruktúrától távol eső helyeken (meteorológiai, szeizmológiai műszerek, stb.).

A mikrobiális üzemanyagcella technológia egy gyorsan fejlődő és rendkívül ígéretes alternatív energiaforrás és szennyvízkezelési lehetőség. Meg kell említeni, hogy a mikrobák

elektromos áramtermelő képességének kiaknázása nem újkeltű gondolat. Az első redox mediátorral működő mikrobiális üzemanyagcella az 1910-es években látott napvilágot, és a 60-as évek elején már mediátor nélküli változatokat is létrehoztak. Az akkori időre jellemzően alacsony fosszilis energiahordozó árak és az üzemanyagcella magas fajlagos költsége miatt nem indultak átfogó fejlesztések ezen a területen. A tudományos ismeretek bővülése (anyagtudományi, mikrobiológiai, bioinformatikai, molekuláris biológiai, stb.), valamint számos új találmány (proton-szelektív membrán, grafitcsúszásos elektródok, nanotechnológiás anyagok, stb.) lehetővé tették, hogy a mikrobiális üzemanyagcellák új, hatékonyabb formát ölthessenek. A mikrobiális üzemanyagcella kutatásában élenjáró országok között található az Amerikai Egyesült Államok, Kanada, Ausztrália, Kína, Egyesült Királyság, Japán, Németország és Dél-Korea. Eddig Ausztráliában működött a legnagyobb teljesítményű félüzemi méretű mikrobiális üzemanyagcella, valamint az Amerikai Egyesült Államokban (kísérleti üzemben). Ezek az üzemanyagcellák a Queensland-i sörgyár szennyvíz kezelésében töltenek be szerepet, valamint az Oakland-en a borászati szennyvízkezelésében vesznek részt.

Az intenzív kutatás és fejlesztés ellenére a mikrobiális üzemanyagcella technológiának még mindig számos akadályt kell leküzdenie. Elterjedését nagymértékben gátolja a léptéknövelés nehézsége. A megoldandó problémák közé tartozik az anódtér teljes térfogatának kihasználása, a protonok intenzívebb anódtérből katódtérbe juttatása, a mikrobák és az elektród közti elektromos kapcsolat javítása, az elektromos feszültség növelése, a katódtér levegőztetésének elhagyása, stb. Szintén problémát jelent, hogy a mikrobák anyagcsere-tulajdonságai még törzsenként is nagymértékben különbözhetnek, ami nagy hatással van az üzemanyagcella teljesítményére. A megfelelő termelő törzs(ek) kiválasztása és fejlesztése nélkülözhetetlen a sikeres mikrobiális üzemanyagcella technológia kidolgozásában. Továbbá a különböző mikroba fajok elektrogén tulajdonságainak megismerése, valamint új típusú elektród-kialakítások elengedhetetlenül fontosak egy stabil és nagy hatékonyságú MÜC-rendszer létrehozásához. Kapcsolódva a témához a doktori kutatásomban a MÜC-rendszerek teljesítményének növelését tűztem ki célul.

A részletes célkitűzéseim a következők voltak:

- Gyors módszer kidolgozása, melynek segítségével különböző mikroba törzsek elektromos áramtermelő képessége becsülhető és modellezhető.
- Módszer kidolgozása a mikroorganizmusok elektrogén profiljának meghatározásához.
- A *Geobacter toluenoxydans* DSMZ 19350 törzs elektrogén profiljának meghatározása: szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságainak feltárása és modellezése mikrobiális üzemanyagcellában való alkalmazás céljára.

- A *Shewanella xiamenensis* DSMZ 22215 törzs elektrogén profiljának meghatározása: szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságainak, felületekhez való tapadási képességének, valamint redox-mediátorok termelésének és tápközeghez adás hatásának vizsgálata mikrobiális üzemanyagcellában való alkalmazásra.
- Elektromosan vezetőképes gél-anód konstrukció létrehozása és alkalmazása különböző üzemű (szakaszos, fél-folytonos és folytonos) mikrobiális üzemanyagcella-rendszerekben.
- Nem-nemesfém alapú lég-katód katalizátor konstrukció létrehozása és egykamrás mikrobiális üzemanyagcella-rendszerekben való alkalmazása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

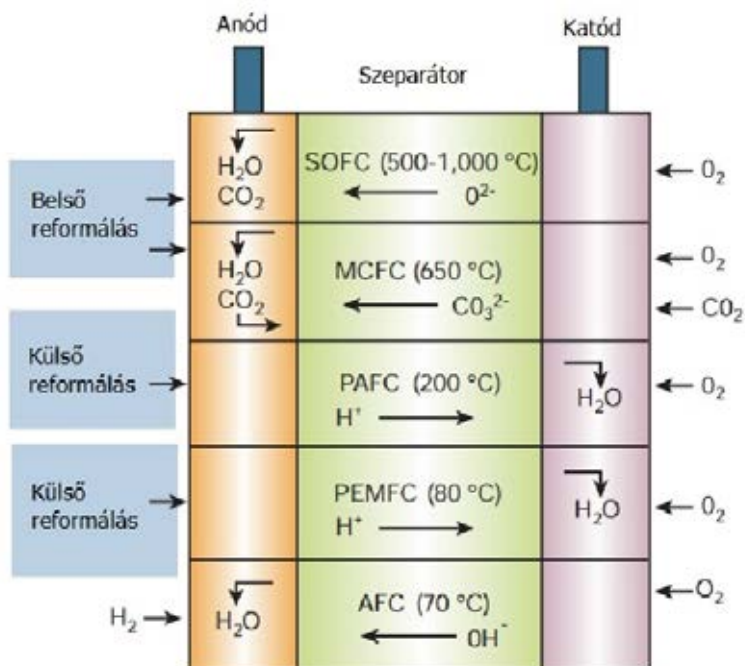
2.1 Üzemanyagcella típusok és csoportosításuk

Az üzemanyag- vagy energiacellák olyan speciális eszközök, amelyek képesek a kémiai energiát közvetlenül elektromos energiává alakítani különböző oxidációs-redukációs reakciókon keresztül (STAMBOULI és TRAVERSA, 2002). Az üzemanyagcellákban energiaforrásként különböző szerves vagy szervetlen anyagokat, mint például természetes gázokat (hidrogén, szénhidrogének, biogáz stb.) vagy alkoholokat (metanol, etanol, butanol, stb.) használnak (KIRUBAKARAN *et al.*, 2009). Bár az üzemanyagcellák és akkumulátorok egyaránt a villamos energia ellátásért felelnek, működési elvük alapvetően különbözik egymástól. Amíg az akkumulátorok csak energiatárolók (külső energiaforrás szükséges a feltöltéshez) és szakaszos működésűek, addig az üzemanyagcellák folytonosan termelnek elektromos áramot üzemanyag felhasználásával.

Az üzemanyagcellák szerkezeti felépítésüket tekintve hasonlóak az akkumulátorokhoz, miszerint tartalmaznak két elektródot (anód és katód). Az üzemanyagcellák elektródjai viszont, a potenciálkülönbség kialakítása érdekében, szeparátorral vannak egymástól elválasztva és nem oldódnak bele az elektrolitba a reakciók során. Ez a szeparátor a legegyszerűbb esetben lehet elektrolit oldat, sóhíd vagy újabban proton-szelektív membrán. A hidrogén alapú üzemanyagcella esetében a működtetéséhez hidrogén és oxigén (levegő) szükséges, míg az alkohol alapú üzemanyagcellákhoz metanolt, etanolt vagy butanolt használnak. A működési elv a következő:

- Az anód felületére üzemanyagot, míg a katód felületére oxigént áramoltatnak.
- Katalizátor segítségével a hidrogén protonokra és elektronokra, az alkoholok protonokra, elektronokra és szén-dioxidra bomlanak.
- A protonok a szeparátoron keresztül áramlanak.
- Az elektronok elektromos fogyasztókon átáramolva érik el a katódot.
- A katódra érkező elektronok a katód felületén lévő katalizátor segítségével egyesülnek a protonokkal és az oxigén molekulákkal vizet hoznak létre.

A folyamat során elektromos áram és hő termelődik. A berendezés egyenáramot termel, de megfelelő áramköri elemek (pl. inverter) közbeiktatásával jól hasznosítható váltakozó árammá alakítható. Mivel az üzemanyagcella rendszer nem égésen alapuló energiaforrás, hanem elektrokémiai reakciókon keresztül hozza létre az elektromos áramot, a káros anyag emissziója mindig jóval kisebb, mint az égési folyamatokon alapuló energiaforrásoké (HAILE, 2003).



1.ábra: Kémiai üzemanyagcella típusok csoportosítása és alapvető működési elvük
(STEELE és HEINZEL, 2001)

A kialakításuk szempontjából számos üzemanyagcella típus létezik. Csoportosításuk alapvetően a szeparator típusa alapján történik, ami jellemzően meghatározza az üzemanyagcella kialakítását, a felhasználható üzemanyagokat, az alkalmazható katalizátorokat, valamint a működési paramétereket. A különböző üzemanyagcella típusokat és működési paramétereiket az 1. ábra és 1. táblázat szemlélteti.

2.1.1 Kémiai üzemanyagcellák

A legrégebb óta alkalmazott kémiai üzemanyagcella típus az alkalikus üzemanyagcella (AFC), amit elsősorban az űrkutatásban használnak. Szeparatorként jellemzően kálium-hidroxid vagy nátrium-hidroxid oldatát alkalmazzák. A szeparator típusa lehetővé teszi a viszonylag alacsony hőmérsékletű reakció körülményeket (60-240 °C) és a platina katalizátor használatát. Üzemanyagként ebben a cellatípusban csak tisztított hidrogén használható. További hátránya ennek a cella típusnak, hogy a korrozív elektrolit által okozott amortizáció és az üzemanyag szennyezések, elsősorban a szén-monoxid és szén-dioxid, az elektromos teljesítmény csökkenését okozhatja (BAGOTZKY *et al.*, 2003).

A proton-szelektív membrán cellák viszonylag alacsony hőmérsékleten (80-100 °C) működnek nagy hatékonysággal. Előnyei közé sorolható a korrózióval szembeni ellenállás, az elektrolit kezelés egyszerűsége és a gyors üzembe helyezés. Hátránya viszont a rendszer

érzékenysége a szennyezésekre, valamint a membrán és a tisztított hidrogén előállításának a magas költsége (APPLEBY, 1996).

A foszforsav cella az első üzemanyagcella, amellyel üzemi szinten hoznak létre elektromos áramot és meleg vizet (KIRUBAKARAN *et al.*, 2009). A legnagyobb reaktor Tokió mellett működik, mely 11 MW/év elektromos teljesítményű. A kialakítás jellegzetessége, hogy szeparátorként folyékony foszforsavat alkalmaznak teflon és szilikon-karbid mátrixban. A porózus elektródokon platina katalizátort használnak a reakció elősegítésére. A megfelelő működtetés hőmérsékleti tartománya 100-250°C (BAGOTZKY *et al.*, 2003). A típus hátránya, hogy a platina katalizátor miatt az üzemanyagként használt hidrogént a szén-monoxidtól mentesíteni kell.

1. táblázat: Kémiai üzemanyagcella típusok (KIRUBAKARAN *et al.*, 2009)

Üzemanyagcella típusa	Szeparátor	Elektromos hatásfok	Üzemanyag	Alkalmazás
Alkalikus elektrolitos cella (AFC)	30% kálium-hidroxid oldat, gél	elméleti: 70% gyakorlati: 62%	H ₂	Katonaság, úrkutatás
Proton-szelektív membrán cella (PEMFC)	protonáteresztő membrán	elméleti: 68% gyakorlati: 50%	H ₂	Biztonsági és hordozható energiatároló
Direkt alkohol cella (DAFC) - Foszforsavas cella (PAFC)	protonáteresztő membrán tömény foszforsav	elméleti: 30% gyakorlati: 26% elméleti: 65% gyakorlati: 60%	metanol, etanol H ₂	Fejlesztés alatt Elosztó rendszerek
Olvadt karbonát cella (MCFC)	lítium-karbonát, kálium-karbonát	elméleti: 65% gyakorlati: 62%	H ₂ , földgáz, biogáz	Elektromos és elosztó rendszerek Kiegészítő energiaforrás, elektromos alkalmazás
Szilárd-oxid cella (SOFC)	ittrium-cirkon oxidkerámia	elméleti: 65% gyakorlati: 62%	H ₂ , földgáz, biogáz	energiaforrás, elektromos alkalmazás

A magas hőmérsékletű üzemanyagcellák közé az olvadék karbonát és szilárd-oxid cella típusok tartoznak, amelyek 650 °C-on illetve 800-1000 °C-on üzemelnek (APPLEBY, 1996). Az olvadék karbonát cella esetében a szeparátort különböző olvadék karbonát sók alkotják lítium-alumínium-oxid mátrixba zárva, míg a szilárd-oxid cella esetében nem-porózus kerámia biztosítja az anód és katódtér elválasztását. A magas hőmérsékletnek köszönhetően a hidrogénen kívül egyéb gázok is felhasználhatók. Ezek nem érzékenyek az üzemanyag tisztaságára, valamint nem szükséges nemesfém katalizátorokat alkalmazni. Magas hőmérsékleten a különböző fénoxidok (pl. NiO₂, FeO₂) is megfelelően katalizálják a hidrogén és egyéb gázok bomlási reakcióját, amit belső reformálásnak nevezünk (APPLEBY, 1996). Hátrányuk azonban, hogy a magas hőmérséklet

jelentősen növeli az üzemeltetési költségeket, a felhasznált vázanyagok költségeit és csökkenti a cellák élettartamát (APPLEBY, 1996; STEELE és HEINZEL, 2001).

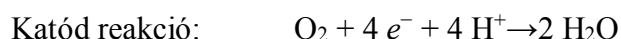
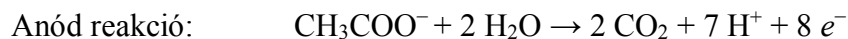
A metanolt üzemanyagként hasznosító üzemanyagcellában membrán szeparátort alkalmaznak (KIRUBAKARAN *et al.*, 2009). A cella jelentősége abból ered, hogy a folyékony üzemanyagok nagyságrendekkel nagyobb energiasűrűségűek, szállításuk és raktározásuk egyszerűbb, olcsóbb és biztonságosabb, mint a gázoké (BAGOTZKY *et al.*, 2003). A technológia rendelkezik minden előnnyel és hátránnyal, amivel a proton-szelektív membrán cellák rendelkeznek. Jelenleg intenzív kutatások folynak ezzel a cellatípussal kapcsolatban (OLAH *et al.*, 2007).

2.1.2 Mikrobiális üzemanyagcella

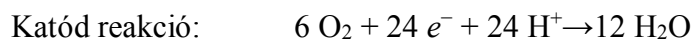
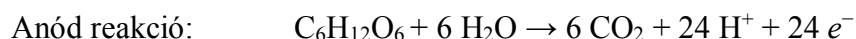
A mikrobiális üzemanyag- vagy energiacella (MÜC vagy MEC) az üzemanyagcellák egy speciális változata, ahol a mikroorganizmus által katalizált oxidációs folyamatok hozzák létre az elektromos áramot. A szubsztrátumként szolgáló szerves és szervetlen anyagokat az egyes mikrobák különböző anyagcsere utakon elektronokká, protonokká és széndioxiddá alakítják át (LOVLEY, 2006a). A megtermelt elektronok különböző transzport folyamatok révén, a sejtfalon kívülre jutnak, majd az üzemanyagcella anódjára kerülnek. Az anódról az elektronok a katódra áramlanak, miközben külső fogyasztón haladnak keresztül, így létrehozva a felhasználható elektromos áramot. A protonok a szeparátoron keresztül jutnak a katódtérhez, ahol elektronokkal és oxigénnel találkozva vízzé egyesülnek.

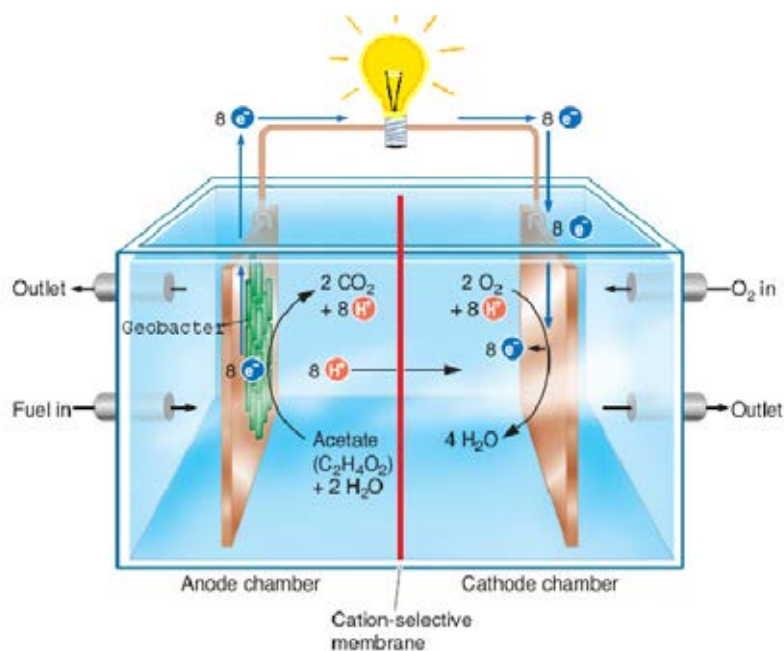
A MÜC felépítését tekintve, a kémiai üzemanyagcellákhoz hasonlóan, tartalmaz egy anód- és egy katódteret, amelyeket proton-szelektív membránnal vagy sóhíddal különítenek el egymástól. Az anódtérben található az anód, a katódtérben pedig a katód. Az elektródterekben a következő reakciók játszódnak le acetát illetve glükóz szubsztrátum esetében (LOVLEY, 2006b):

Acetát szubsztrátum (szennyvízre jellemző) (2. ábra)



Glükóz szubsztrátum (CHAUDHURI és LOVLEY, 2003):





2. ábra: A mikrobiális üzemanyagcella felépítése és működési elve az acetát szubsztrátum példáján (LOVLEY, 2006b)

A MÜC működésére, jellegéből adódóan, számos biotikus és abiotikus tényező hatással lehet. A környezeti paramétereken (hőmérséklet, pH, tápközeg összetétel, stb.) túl kiemelt jelentőségű az alkalmazott mikroorganizmusnak vagy mikroba közösségnek a tulajdonságai valamint a reaktor kialakításának és összetevőinek minősége (GIL *et al.*, 2003).

2.2 Mikrobiális üzemanyagcella kialakítások

Az üzemanyagcellák kialakításukat tekintve két főbb típusba sorolhatók: kétkamrás vagy egykamrás mikrobiális üzemanyagcellák. A kétkamrás üzemanyagcellák esetében van külön anód- és katódtér, míg az egykamrás kialakításnál a katód közvetlenül érintkezik a levegővel (DU *et al.*, 2007).

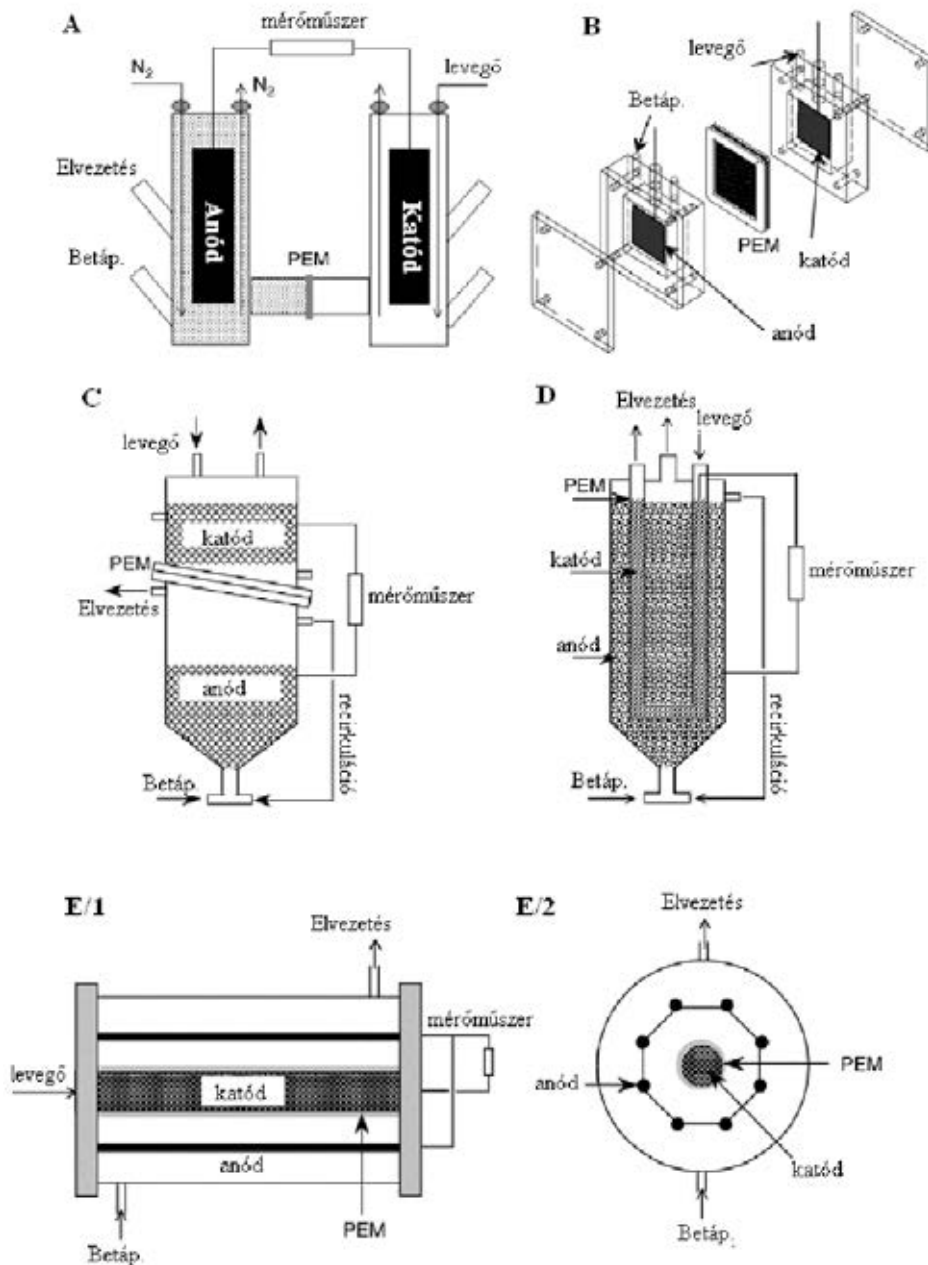
Kezdeti kutatásokban elsősorban az ún. „H-formájú” MÜC-t alkalmazták, mivel ezeket az eszközöket viszonylag kis átalakítással laboratóriumi üvegeszközökből is létre lehet hozni (3. ábra, A). Hátrányuk azonban, hogy még proton-szelektív membrán használata esetén is nagy a belső ellenállás, mivel a két elektród viszonylag messze helyezkedik el egymástól.

A „szendvics-forma” MÜC a legelterjedtebb üzemanyagcella kialakítás, mind mikrobiális mind kémiai üzemanyagcellák esetében (3. ábra, B). Előnye a kompakt kivitel, kis belső ellenállás és az egyszerű bővíthetőség további cellákkal. Hátránya, hogy a cella hasznos térfogata kicsi és léptéknövelése nehéz.

Alsó betáplálású MÜC esetében a katódtér az anódtér fölött helyezkedik el. A katódtér akár nyitott is lehet az oxigén szabad beáramlása érdekében (3. ábra, C). Ezek a reaktor típusok már léptéknövelésre is alkalmasak, és jól hasznosíthatók szennyvíztisztítási folyamatok kiegészítéseként (HE *et al.*, 2005; 2006). A megfelelő mértékű szerves anyag eltávolítás érdekében, a szennyvíztisztítási alkalmazásoknál recirkulációt is használnak, azonban a folyadékáramoltatás energiaköltségei meghaladják az üzemanyagcella energia kihozatalát, ezért az ilyen kialakítás elsődleges funkciója inkább a szennyvízkezelés és nem az elektromos áramtermelés.

Az alsó betáplálású MÜC-rendszer egy másik altípusánál, amikor a katódrész U-alakban bemerül a cellába, és ezt a részt levegőztetik (3. ábra, D). A H-forma MÜC esetében a belső ellenállás nagyon alacsony, mivel az anód és a katód közel helyezkednek el, csupán egy proton-szelektív membránfelület választja el a két térrészt.

Az egyik legújabb MÜC konstrukció az ún. multi-anód MÜC-rendszer, aminek lehet egy- és kétkamrás kivitele is. Ez a reaktor tartalmaz egy hengeres testet, amiben több grafit rúd anódot helyeznek el koncentrikusan a közepén lévő katódtér körül, proton-szelektív membránnal elválasztva (3. ábra, E). A katódtér lehet porózus szerkezetű, amin folyadékot vagy közvetlenül levegőt áramoltatnak keresztül (LIU *et al.*, 2004).



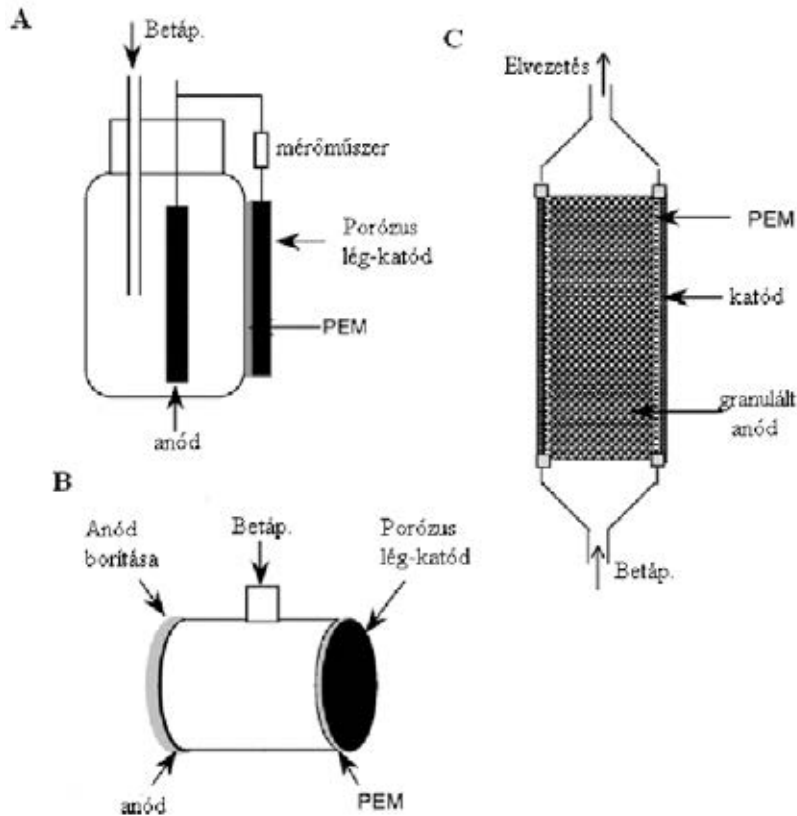
3. ábra: Különböző kétcellás MÜC kialakítások (A: H-forma MÜC; B: Szendvicsforma MÜC; C: Alsó betáplálású MÜC; D: U-forma MÜC; E: multi-anód MÜC) (DU *et al.*, 2007)

Egykamrás MÜC kialakítások közül a legegyszerűbb kivitelű az ún. „ablakszerű” légkatódos üzemanyagcella, ahol a reaktor falára vágott nyílásra illesztik a proton-szelektív membránt, amely közvetlenül érintkezik a légkatóddal (4. ábra, A). Ezt a típust csak laboratóriumi kísérletekben alkalmazzák mivel nehéz a léptéknövelése és a belső ellenállása is nagyobb a többi MÜC kialakítással összehasonlítva.

Laboratóriumi kísérletekben gyakori a „csőszerű” MÜC, ahol a kamra egyik végében található az anód a másik végében membránnal elválasztva a katód (4. ábra, B). Az anód

közvetlenül nem érintkezik a levegővel, míg a katód igen. Ez a kialakítás egyszerű, azonban az elektródok messze helyezkednek el egymástól, így jelentős belső ellenállású.

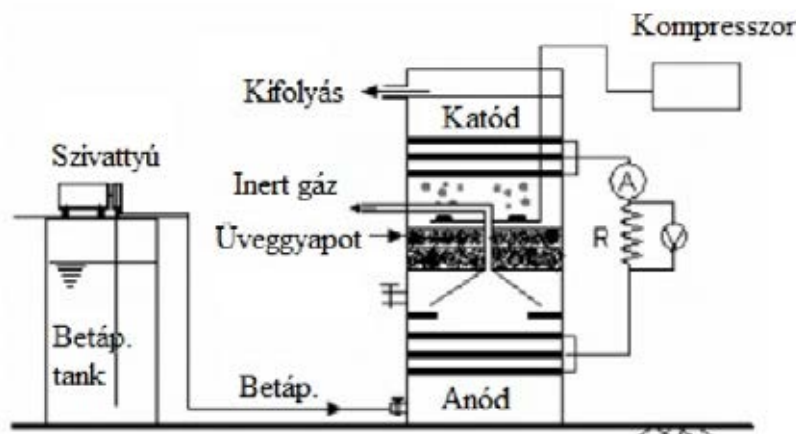
Az egykamrás kialakítások közül a legegyszerűbben léptéknövelhető kivétel az átfolyó anódterű (flow-cell) MÜC. Ebben a MÜC rendszerben a reaktortest oldala perforált, ezzel biztosítva a proton gradienst a membránon keresztül a két elektród között. A cella anódja porózus vagy granulátum szerkezetű, hogy a tápközeg áthaladását biztosítsa a reaktor tölteten keresztül (4. ábra, C).



4. ábra: Különböző egykamrás MÜC kialakítások (A: ablak-forma MÜC; B: cső-forma MÜC; C: átfolyó anódterű MÜC) (DU *et al.*, 2007)

A felsorolt üzemanyagcella konstrukciók nagy része képes szakaszos, fél-folytonos és folytonos üzemmódban is működni. Az elektrontranszfer vonatkozásában alapvetően két típust különböztetünk meg: elektronközvetítővel (mediátor) ellátott üzemanyagcellák és közvetítő nélküliek. Az elektronközvetítő anyagok (mediátorok) abban az esetben alkalmazandók, ha a mikroba kultúra nem képes az anódnak közvetlenül átadni az elektronokat (LOGAN *et al.*, 2006). A mediátor nélküli MÜC esetében olyan baktériumokat használnak, amelyek képesek a megtermelt elektronokat beavatkozás nélkül az üzemanyagcella elektródjára eljuttatni (REGUERA *et al.*, 2005). Természetesen a mediátorok alkalmazása nagymértékben megnehezíti a folytonos rendszer kialakításának lehetőségét, hiszen az elhasznált üzemanyag mellett a mediátor molekulák is eltávoznak a reaktortérből.

A membrán nélküli mikrobiális üzemanyagcellák egy különleges csoportot képeznek. A „konvencionális” MÜC-cel ellentétben ezek a kialakítások nem rendelkeznek membránnal vagy sóhíddal, így az anolit szabadon áramolhat át a katódtérbe. Az anód a cella alján a katód pedig a tetején helyezkedik el. A kialakítás lényege, hogy az anód- és a katódtér üvegyöngyökkel és üvegyapottal van elválasztva, ami nem engedi a katódtérbe vezetett levegő/oxigén buborékokat az anódhoz, így tartva meg a potenciál különbséget a két tér között (5. ábra) (GHANGREKAR és SHINDE, 2007). A szeparátor nélküli kialakításoknál, ahol semmit nem használnak az anód- és katódtér elválasztására, a tápközeg és a bevezetett oxigén ellenárama által okozott diffúzió gátolódásának köszönhetően oxigén gradiens alakul ki, amely biztosítja a MÜC megfelelő működését. Egyes esetekben inert gázt is vezethetnek az anódtér felső részébe, hogy az oxigén beáramlását meggátolják (JANG *et al.*, 2004).

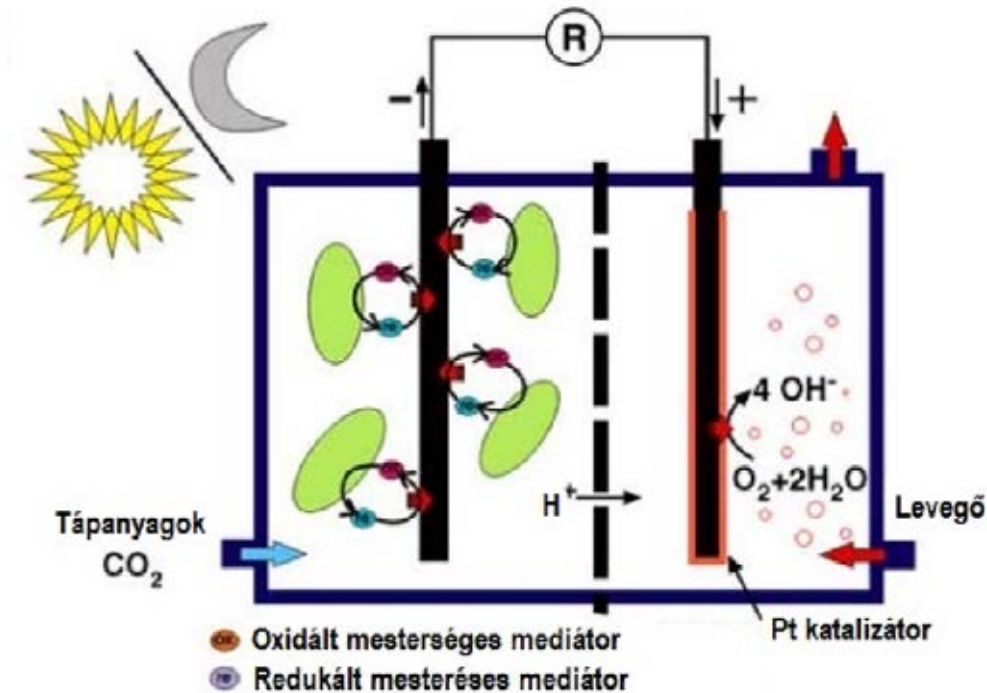


5. ábra: Membrán nélküli MÜC kialakítás (GHANGREKAR és SHINDE, 2007)

A membrán nélküli MÜC létrehozását a proton-szelektív membránok magas költségei ösztönözték, mivel az üzemanyagcellák költségeinek jelentős részét a membrán teszi ki. A membrán nélküli konstrukciók lehetőséget nyújtanak a léptéknövelésre, valamint kifejezetten alkalmas szennyvíztisztításra, mivel membrán hiányában a korrozív anyagok okozta degradáció elhanyagolható. Ez a konstrukció csak folytonos üzemben alkalmazható és lehetőséget nyújt a léptéknövelésre, valamint kifejezetten alkalmas a szennyvíztisztításra, hiszen membrán hiányában a korrozív anyagok okozta degradáció elhanyagolható. A folytonos gáz (inert vagy levegő) és szubsztrátum áramoltatás jelentős energiafelhasználást igényel (DU *et al.*, 2007).

Azokat az üzemanyagcellákat, ahol a napfényt a mikroorganizmus elektromos árammá alakítja, a szakirodalom fotoszintetikus mikrobiális üzemanyagcelláknak nevezi (ROSENBAUM *et al.*, 2010). A foto-MÜC-nek több típusa is ismeretes. Elsőként az ún. mesterséges mediátoros foto-MÜC-t fejlesztették ki, ahol főleg *Cyanobacter* fajokat alkalmaztak bio-katalizátorként,

mesterséges redox mediátor hozzáadásával. A mediátoros foto-MÜC működési elvét a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra: A mediátort használó foto-MÜC működési elve
(ROSENBAUM *et al.*, 2010)

A működés során fény és sötét fázis különíthető el. A fény fázisban a fotoszintézisre képes mikrobák szénhidrátokat állítanak elő szén-dioxidból és vízből, miközben oxigént szabadítanak fel. A sötét fázisban a mikroorganizmusok eloxidálják a szintetizált szénhidrátokat és a mediátor által létrehozott elektrontranszportlánc segítségével az elektronok az anódra kerülnek, létrehozva az elektromos áramot (ROSENBAUM *et al.*, 2010). A foto-MÜC-nek több típusa létezik, mint a mediátor nélküli alga reaktor, vagy a szeparált foto-MÜC konstrukcióknak, amelyek esetében külön bioreaktorban algákat szaporítanak, majd az alga biomasszát kiszárítják, megőrlik és szubsztrátumként használják fel az üzemanyagcellában. A foto-MÜC reaktorok előnye, hogy környezetkímélő módon képesek elektromos áramot létrehozni, azonban még nagyon alacsony hatásfokú a többi mikrobiális üzemanyagcellához képest is.

2.3 Mikrobiális üzemanyagcella elektród kialakítások

2.3.1 Anód kialakítások és fejlesztési lehetőségek

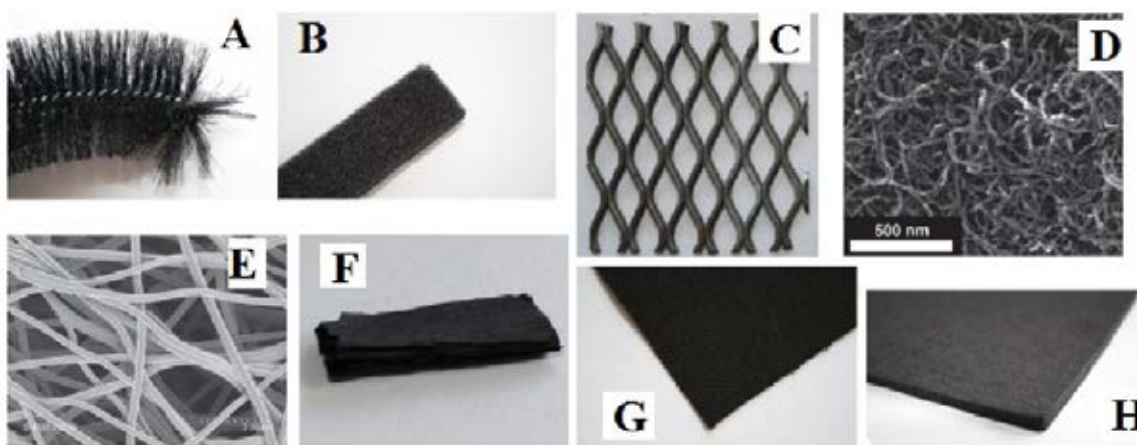
A mikrobiális üzemanyagcella anódja az elektrobiológiai rendszer egyik legmeghatározóbb része, mivel a mikroorganizmusok az anyagcseréjükkel származó elektronjaikat az anód felületén keresztül tudják továbbítani más részekhez. Az üzemanyagcella

teljesítményének növelése érdekében érdemes az anódkonstrukciót optimalni a következő szempontok figyelembe vételével (KUMAR *et al.*, 2013):

- Az anód kialakítása során az egyik legfontosabb szempont, hogy **jó elektromos vezetőképességgel** rendelkező anyagból kerüljön kialakításra (LOGAN, 2008). AELTERMAN és munkatársai (2008) a mikrobiális üzemanyagcella ellenállásainak vizsgálata során megállapították, hogy a belső ellenállás jelentős része származhat az anódból és jelentősen növelhető a teljesítmény az elektródok elektromos vezetőképességének növelésével.
- Habár az anódtérben döntő részben anaerob viszonyok uralkodnak, mégis egyes kialakítások esetén oxigénnel vagy más korrozív anyaggal érintkezhet az elektród, továbbá a MÜC biológiai rendszer, ezért érdemes **nem korrodálódó** biológiailag nem degradálódó anyagokat alkalmazni.
- Kiemelt fontosságú, hogy az anód anyagát tekintve **ne** legyen **toxikus** hatású a mikroorganizmusokra, mert jelentős hatása van az energiatermelő folyamat katalizátorainak működésére. Tehát például rézelektrodok és antimikrobás felületkezelési módszerek nem alkalmasak (GRASS *et al.*, 2011).
- Jelentős mértékben elősegíti az elektromos áramtermelést, ha az anód **nagy fajlagos felületű**, mivel egyidőben nagyobb mennyiségű mikroba képes részt venni a reakciókban, valamint nagyobb az esély a mikrobasejt-elektrod interakciók kialakulására. A nagy fajlagos felület több módon is elérhető. Az anód felületének érdesítésével, perforációval, bevonatok készítésével, granulátumok alkalmazásával, vagy vezetőképes mátrixok (háromdimenziós elektródok) használatával. A különböző megoldásokra számos példát találhatunk a szakirodalomban, azonban a közeljövőben a háromdimenziós elektródok elterjedésére lehet számítani, hiszen ezen elektród kialakítások hatékonysága egy nagyságrenddel nagyobb lehet, mint csupán a sík elektródlapokkal működő konstrukcióké (AELTERMAN *et al.*, 2008).
- A különböző konstrukciók különböző anódkialakítást igényelnek, így fontos további tulajdonság a **könnyű megmunkálhatóság** és a kellően nagy **mechanikai ellenállás** (WEI *et al.*, 2011).
- A következő nem elhanyagolható szempont, hogy az alkalmazott anyag könnyen és **alacsony költségekkel** beszerezhető legyen, valamint, hogy a **léptéknövelésre** is alkalmas megoldásokat lehessen belőle kialakítani. Ezen tulajdonság elengedhetetlen a releváns ipari rendszer létrehozásához (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2.3.1.1 MÜC anód anyagok

A grafit anód általánosan elterjedt a MÜC-rendszerekben, mivel viszonylag alacsony költséggel létrehozható, könnyen megmunkálható és jó elektromos vezetőképességű, továbbá megfelelően ellenáll a korrózióknak és biodegradációnak. Mikrobiális üzemanyagcellákban lemez és szövet formában (7. ábra, G, H, E és F) a legelterjedtebb, azonban granulátumokkal, szénkefékkel (7. ábra, A), hálókcal (7. ábra, C), szénhabokkal (7. ábra, B), és szén-nanocsövekkel (7. ábra, D) is folynak kutatások az anódként való alkalmazás érdekében (WANG *et al.*, 2009a).



7. ábra: Különböző kialakítású grafit elektródok (KRIEG *et al.*, 2014)

A különböző grafit alapú anódok számos előnyös és hátrányos tulajdonsággal rendelkeznek. A grafitrud vagy -lap jó elektromos vezetőképességű, alacsony költségű és könnyen beszerezhető. Hátrányuk azonban, hogy viszonylag kis fajlagos felületűek, amelyet nehéz módosítani.

A grafitrost kefék (szénkefék) előnyös tulajdonságai közé tartozik, hogy nagy fajlagos felületűek és egyszerűen előállíthatók. Folytonos üzemű MÜC-rendszerekben azonban könnyen eltömődhetnek. Elsőként LOGAN és munkatársai (2008) számoltak be erről az anód kialakításról. A tanulmányban létrehozott grafit kefével $2,4 \text{ W/m}^2$ fajlagos teljesítményt tudtak létrehozni 95%-os porozitású anóddal. A sűrűbb kialakítású kefék esetén sem voltak képesek nagyobb kihozatalet elérni, ami feltételezhetően a szálak összetapadása miatt következhetett be.

A grafit lapok után a grafit szövet a leggyakrabban alkalmazott anód anyag. Nagy fajlagos porozitásúak (nagy felületűek), így lényegesen több mikroba képes megtelepedni a felületükön, azonban előállításuk költséges, és mechanikai tulajdonságaik sem teszik lehetővé a hosszú távú használatukat (WEI *et al.*, 2011).

A szénhab kialakítású elektródok rendkívül nagy fajlagos felületűek, azonban könnyen eltömődnek, valamint merevek és törékenyek. A grafit habosítása energiaigényes eljárás, ami

tovább csökkenti az elterjedését (WEI *et al.*, 2011). Az anódtér nagy része kihasználható, ha grafit granulátumot alkalmazunk elektródként, így létrehozható a töltött ágyas reaktorhoz hasonló kialakítás (rendezett vagy rendezetlen töltet). A rendezett granulátumok, a szabályozott elhelyezkedés miatt, jobb elektromos vezetőképességűek, azonban így csökken a fajlagos felületük. A szabálytalan alakú töltetekkel nagyobb felületen való elektrontranszfer kialakítása lehetséges, viszont nagyobb a belső ellenállása. A töltetek hátránya, hogy fennáll az eltömődés veszélye. Erről a kialakításról elsőként RABAEY és munkatársai (2005a) számoltak be. MÜC-rendszerükkel 95 W/m^3 fajlagos teljesítményt tudtak elérni.

A fémes anyagok jobb elektromos vezetőképességűek, mint a szénelapúak, azonban mégsem hasznosíthatók olyan széleskörűen a mikrobiális üzemanyagcella rendszerekben. A fémek többsége nem jöhet számításba, a korrózióval szembeni nem megfelelő ellenállóképességük, valamint antimikrobás tulajdonságuk miatt. Egyes kutató csoportok rozsdamentes acélokat (DUMAS *et al.*, 2007), alumíniumot (OUIRAKUL *et al.*, 2007), titánt és más mikrobákra ártalmatlan fémeket (AKMAN *et al.*, 2013) használtak anódként. Kis felületi érdességük miatt még különböző kezelésekkel együtt is kisebb a fajlagos felületük, mint a grafit elektródoké. Ez jelentősen rontja a mikrobák megtapadásának és a biofilm kialakulásának lehetőségét (WEI *et al.*, 2011).

Új típusú anódként megjelentek a különböző ötvözetek és fémbevonatú nemfémes elektródok. Ezeket gőzöléssel vagy galvanizálással hozzák létre, így egy olcsóbb azonban, mikrobákra toxikus hatású anyagot is elektródként lehet alkalmazni (pl. rézre titán bevonat) (WEI *et al.*, 2011).

2.3.1.2 Anódok fizikai és kémiai felületkezelése

Számos tanulmány beszámol arról, hogy az anód felületének módosításával jelentősen növelhető a MÜC teljesítménye (WEI *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2011). A felületi módosítások lehetnek fizikai, kémiai természetűek vagy ezek kombinációi. Fizikai módosítások során hőközléssel, elektrokémiai oxidációval vagy dörzsöléssel kísérlik meg növelni az elektród felületi érdességét (WANG *et al.*, 2009a).

Kémiai módosítások elsősorban savas (sósavas, kénsavas, salétromsavas, citromsavas, stb.) vagy ammóniás kezeléssel állnak, de más anyagokat is rögzíthetnek az anód felszínére az elektrontranszport megkönnyítésére (pl. fém-oxidokat, antrakinont, stb.) (LOWY *et al.*, 2006). Ha fém elektródot alkalmazunk, a kezelés hatására a fém felületét a sav megmarja, így növelve a felület nagyságát, vagy például salétromsavas kezelés hatására NO_3 -gyökök keletkeznek a felületen, amihez a mikrobák könnyebben tudnak tapadni (CAI *et al.*, 2013).

A felületkezelés sikerességét jól mutatja FENG és munkatársainak (2010) tanulmánya, amelyben fizikai (hő), kémiai (ammónia) kezeléseket, valamint ezek kombinációját alkalmazták a grafit-kefe anód módosítására. A hőkezelés hatására csupán 7%-kal növekedett az üzemanyagcella teljesítménye, míg az ammónia kezelés már 25%-kal növelte a kinyerhető elektromos áramot. A két kezelés ötvözése azonban már 34%-kal növelte a fajlagos elektromos teljesítményt (1,02-ről 1,37 W/m²-re).

2.3.1.3 Nanotechnológiai és nanokompozit anódkialakítások

Az anód nanostruktúrális anyagokkal történő módosítása és tanulmányozása széleskörűen elterjedté vált a MŰC alkalmazások esetén. Nanostruktúrális anyagok segítségével növelhető az elektródok fajlagos felülete, ami kedvezően befolyásolja a rendszer teljesítményét. A biokompatibilitás az egyik fő kitétel az anódok módosítása tekintetében, így elkerülhetetlen a nanopartikulumok mikrobák életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata (KUMAR *et al.*, 2013). Az elmúlt években számos anód-nanokompozit kialakítást hoztak létre, amelyek alkalmazása jelentősen növelte a mikrobiális üzemanyagcella teljesítményét.

Elterjedt megoldás az üzemanyagcella anódjának szén nanocsövekkel (CNT) történő módosítása. A CNT-k bizonyítottan megfelelő közvetítő anyagként szolgálnak a mikrobák és az anód között. A szén nanocsövek a szénnek egy speciális módosulata, amelyek 1-2 nm átmérőjűek, de akár több mikrométer hosszúságot is elérő, csöveket alkotó szénhálók is lehetnek. Az anyag szerkezeti tulajdonságaiból származóan jó elektromos vezetőképességű és nagy fajlagos felületű. A szén nanocsöveket az elektronika számos területén előszeretettel alkalmazzák (MINTEER *et al.*, 2012). A mikrobiális üzemanyagcella alkalmazásai is ismertek annak ellenére, hogy a közel múltban egyes szén nanocső módosulatok citotoxikus hatását bizonyították (FLAHAUT *et al.*, 2006). A citotoxicitás kiküszöbölése érdekében más anyagokkal együtt használják ezt a komponenst például szén nanocső/polianilin kompozittal (QIAO *et al.*, 2007).

Az újonnan létrehozott nanokompozit anyagok közül a grafén jelentősége növekedett a leginkább a 2004-es felfedezése óta. A grafén planáris hatszögletű lapokat alkotó sp² hibridizált szénatomokból épül fel, ami figyelemre méltó fizikai tulajdonságokat, például jó hő és elektromos vezetőképességet és rugalmasságot, kölcsönöz az anyagnak. Összehasonlításképpen a grafén becsült fajlagos felülete többszöröse más szén-nanokompozit anyagénak (ZHU és DONG, 2013). Ezek a különleges tulajdonságok teszik lehetővé használatukat a mikrobiális üzemanyagcella fejlesztésében. Elektródként vagy felületmódosítóként alkalmazva jelentősen növeli a felületet, miközben az anód elektromos ellenállása csökken, így növelhető a kinyerhető elektromos energia (YUAN és HE, 2015). Grafént legtöbbször konduktív polimerekkel, (polianilinnal, polipirrolal,

stb.) ötvözik, hogy a polimerrel együtt nagyfelületű porózus elektródot hozzanak létre, így egy rendkívül jól hasznosítható MÜC elektród kialakítása válik lehetővé. Ez a technológia kidolgozása azonban még csak kezdeti fázisban van, így további kutatás szükséges a stabil rendszer kialakításához.

A polimerhálók jellegzetesen nagy fajlagos felületűek azonban, többségük elektromosan szigetelő tulajdonságú. Egyes esetekben a szigetelő polimerek felületére fémeket gőzölnek, vagy kondenzálnak, olyan bevonatot képezve, ami kiválóan alkalmazható anódként (ZHOU *et al.*, 2011). Léteznek anódkonstrukciók, amelyeket elektro-konduktív polimerek segítségével hoznak létre és használnak üzemanyagcella elektródként. Számos ipari területen alkalmaznak konduktív polimereket, közülük az orvosi és diagnosztikai felhasználásúak a legjelentősebbek (pl. polipirrol, polianilin, stb). Ezen polimerek konjugált kettős kötéssel kapcsolódó monomer egységekből épülnek fel, amelyeken keresztül az elektronok képesek tovább haladni (GUISEPPI-ELIE, 2010). A MÜC rendszerek szempontjából a konduktív polimerek között kiemelt jelentőségű a polianilin. Anódkonstrukciókban a polianilint általában nem önmagában, hanem más vezetőképes anyagokkal kiegészítve alkalmazzák. Leggyakrabban a különböző grafit elektród típusok felületére kondenzálják vagy a grafit szövetet egészítik ki ezzel az anyaggal. PRASAD és munkatársai (2007) kutatásukban grafit szövet anód felületére rögzítettek polianilin/platina kompozitot, ami több mint négyszeresére növelte a MÜC-rendszer fajlagos elektromos teljesítményét a kezeletlen elektródhoz képest (0,69-ről 2,9 W/m²-re).

A polipirrollal végzett kísérletek is hasonlóan ígéretesnek mutatkoztak. Anódként alkalmazott grafit lapok polipirrollal való módosítása 452 mW/m² fajlagos teljesítményt eredményezett, ami kétszerese a kezeletlen grafit lemezen mért eredményeknek (YUAN és KIM, 2008).

2.3.2 Katód kialakítások és fejlesztési lehetőségek

A katód kialakítása a MÜC szerkezetének egyik legnagyobb kihívása, mivel a MÜC katódja egy háromfázisú reakció helyszíne. Az oxigén (gáz), vízben lévő protonok (folyadék) és elektródon haladó elektronok (szilárd) a katód felületén reagálnak egymással és hoznak létre vizet, ami zárja az üzemanyagcella áramkörét. A nem megfelelő katód kialakítás drasztikusan korlátozhatja a cella elektromos teljesítményét (GIL *et al.*, 2003; LOGAN, 2010). A katód létrehozásakor érdemes figyelembe venni a következő tulajdonságokat:

- Ha a katód jó vezetőképeséssel rendelkező anyagból készül, az elősegíti, hogy az elektronok a lehető legkisebb veszteséggel jussanak a katódtérbe (ZHOU *et al.*, 2011).

- A reakció szempontjából érdemes nagy felületű katódot létrehozni, hogy a megnövelt felületen egyidőben több reakció tudjon végbe menni. CHENG és munkatársai (2011) kutatásukban a katód felületének megkétszerezésével 62%-kal növelték a MÜC-rendszerük teljesítményét.
- A léptéknövelés szempontjából nélkülözhetetlen a katód előállítási költsége. Ebből a szempontból több kialakítás esetében is fémeket használtak, melyek kisebb költségekkel létrehozhatók és alakíthatók (SELEMBO *et al.*, 2009).
- A katódtérben oxidálószerket (pl. oxigén, kálium-permanganát) alkalmaznak a potenciálkülönbség kialakítás érdekében, így a katódnak ellenállónak kell lennie a korrózióval szemben (CHENG *et al.*, 2006a).

Az üzemanyagcella kialakítása szerint a katód lehet elektrolitba merülő, ami a kétkamrás üzemanyagcellákra jellemző, vagy közvetlenül a levegő oxigénjét hasznosító, légkatód jellegű, ami az egykamrás üzemanyagcellák elengedhetetlen tartozéka. Mindkét kialakításnak vannak előnyei és hátrányai. A folyadékba merülő katód előnyeikhez sorolható, hogy kialakítása egyszerűbb, a kisebb oxigén jelenlét miatt kevesebb oxigént enged át az anódtérbe, valamint az oxigén helyett más oxidálószer alkalmazását (kálium-permanganát, kálium-hexaferro-cianát, stb.) is lehetővé teszi az üzemanyagcellában. Ugyanakkor a folyadékközeg miatt a cella belső ellenállása nagyobb, valamint a vízben oldott oxigén koncentrációját csak költségesen lehet megfelelő szinten tartani (KIM *et al.*, 2007).

Ezzel szemben a légkatód kialakítás nem igényel levegőztetést, mivel a levegő oxigénjével közvetlenül érintkezik és az üzemanyagcella helyigénye is kisebb (csak egy kamrából áll). Létrehozása azonban kihívásokkal teli mérnöki feladat, mely során meg kell oldani, hogy a membránon keresztül áramló protonok, az elektródról érkező elektronok és a levegő oxigénje egyesülni tudjon, közben ne kerüljön oxigén az anódtérbe és az anódtérből minél kevesebb víz távozzon. Az oxigén és a nedvesség visszatartására különböző teflon szigeteléseket alkalmaznak (LIU *et al.*, 2012a), ami viszont ronthatja az oxigén elektród felületére jutását (ZHOU *et al.*, 2011).

2.3.2.1 MÜC katód anyagok

Jelenleg általánosan elterjedt a grafit lap, szövet és fólia alkalmazása a mikrobiális üzemanyagcella katódjaként, mind a folyadékba merülő, mind a légkatód kialakításokban. Az anyaghasználatot tekintve megoszlik a kutatók véleménye. Kutatók egyik csoportja a nagy felületi érdességű szénelapú anyagokat részesíti előnyben, míg másik fele a fémek használatát javasolja. YOU és munkatársai (2011) tanulmányukban egy új típusú, membránhoz kötött légkatódot hoztak létre, amelynek az alapját rozsdamentes acélhálóból alkották. Ezzel a katód-kialakítással hasonló teljesítményt értek el, mint a grafit szövetet használó katóddal. További kutatások is arról

számolnak be, hogy a katód alapanyagául érdemesebb fémek anyagokat választani, mivel könnyebben megmunkálhatók, hosszútávon is stabilak és ellenállóak, valamint elektromos tulajdonságaik is kiválóak (WEI *et al.*, 2011). A fémek közül első sorban a rozsdamentes acélt, alumíniumot, mangánt, nikkelt és titánt preferálták, mivel ezek a fémek jó elektromos vezető és megmunkálhatósági tulajdonságokkal rendelkeznek, azonban többségük csak drágán szerezhető be, ami költségessé teszi alkalmazásukat. Az olcsóbb, de kevésbé hatékony és a költségesebb, de megfelelőbb tulajdonságú fémek ötvözésével (pl. acél/mangán vagy acél/nikkel) megfelelő katód kialakítások érhetőek el (SELEMBO *et al.*, 2009).

2.3.2.2 Katód katalizátorok

Egyes szerzők szerint a katód-reakció nem megy végbe megfelelő sebességgel, ha csupán grafit lemezt vagy szövetet alkalmazunk üzemanyagcella katódjaként (KIM *et al.*, 2007) ezért azok katalizátorokkal való bevonása szükséges. A leghatékonyabb elektromos áramtermelést eddig nemesfém-alapú katalizátorokkal (platina, palládium, ruténium és ezek ötvözetei) tudták elérni. PHAM és munkatársai (2004) szerint a platinával módosított grafit elektróddal 4-szer nagyobb teljesítményt értek el, mint csupán grafitot használva katódként. A nemesfémek magas ára miatt azonban költséges a használatuk, ami megnehezíti a katód gazdaságos léptéknövelését. Emiatt platina és egyéb nemesfémek helyettesítésére a kutatók olyan katód-katalizátor alternatívákat keresnek, amelyek hasonlóan nagy hatékonysággal képesek segíteni az oxigén felhasználását. Kutatások irányulnak az olcsóbb, viszont hasonló katalízist produkáló anyagok és kompozitok létrehozására (BEN LIEW *et al.*, 2014). A nemesfémek helyettesítésére különböző átmeneti fémek (LEFEVRE és DODELET, 2003), fémötvözetek (SELEMBO *et al.*, 2009), fém-oxidok (ZHANG *et al.*, 2009), nanokristályos fémek, konduktív polimerek (ZHANG *et al.*, 2007), módosított grafén (ZHU és DONG, 2013) és szén-nanocsövek (LI *et al.*, 2011) alkalmazásával próbálkoztak. Ezeknek a katalizátoroknak a határfoka jelentősen kisebb volt, mint a nemesfémeké (BEN LIEW *et al.*, 2014). További kutatások beszámolnak vas(III)-ról (PARK és ZEIKUS, 2002), mangán-oxidról (RHOADS *et al.*, 2005), vas-komplexekről (ZHAO *et al.*, 2006), kobalt komplexekről (CHENG *et al.*, 2006b) és nikkelről (LIU *et al.*, 2012b), mint lehetséges alternatívákról (WATANABE, 2008).

Az anódkialakításokhoz hasonlóan egyre több kutatás témája az új típusú nanokompozit anyagok katódként való alkalmazása. A különböző katalitikus tulajdonságú anyagok egyesítésével a mikrobiális üzemanyagcella teljesítménye eredményesen növelhető. A különböző mangán-oxid módosulatokból (α , β és γ) és a szén nanocsövekből létrehozott kompozit anyag ugyan nem érte el a platina bevonatú katód teljesítményét, de megközelítette, és az összetétel optimalizálásával tovább csökkenthető a különbség (LU *et al.*, 2011). Egykamrás MÜC-rendszer esetében vizsgálták a

kobalt-tetrametoxi-fenilporfrin (CoTMPP) nanokompozit katód katalizátor elektromos áramteremlésre gyakorolt hatását és összehasonlították a platina katalizátort használó beállítással (CHENG *et al.*, 2006a). A kutatás eredményeként megállapították, hogy a nanokompozit katalitikus aktivitása hasonló a platináéhoz, így van lehetőség nemesfém nélküli nagy teljesítményű katód kialakítás létrehozására egyéb nem-nemesfémek alkalmazásával. További kísérletekben a CoTMPP kompozitot más vegyületekkel is módosították (mint pirolizált vas(II)-ftalocianin), amellyel tovább növelték a cella elektromos teljesítményét (WATANABE, 2008).

Az új típusú anyagok, mint a grafén, használata a katód kialakításokban is egyre nagyobb szerepet kapnak. A grafén ígéretes katód-katalizátor összetevőnek bizonyult számos esetben, mivel nagyszerű elektromos vezetési és felületi oxigén redukációs képességű. Hátránya azonban, hogy még nem áll rendelkezésre gazdaságos grafén előállítási módszer, így egyelőre csak laboratóriumi kísérletek folynak ezzel az anyaggal (YUAN és HE, 2015). Egykamrás MÜC rendszerben a grafén/polianilin nanokompozittal létrehozott katódkialakítás kétszeresére növelte az üzemanyagcella teljesítményét (ANSARI *et al.*, 2014).

A kémiai katalízis mellett forradalmi megoldásként jelentek meg az úgynevezett bio-katódok, amelyeknél az anódhoz hasonlóan mikrobás katalízis végzi a végső oxidációt. Az abiotikus katódok nagy költségével, nehézkes kialakításával, környezetre ártalmas tulajdonságaival szemben a bio-katódok megfelelő alternatívaként jelentek meg. Annak ellenére, hogy az anód-mikroba közti elektrontranszfert számos mikroba esetében kutatták és leírták, a katód és a mikrobák közti elektronátadásról jelenleg kevés információ áll rendelkezésre. A bio-katódok jelentősége a viszonylag alacsony költségeiben, megfelelő stabilitásában és multifunkcionális tulajdonságaiban (pl. bio-katód esetében a katódtér is alkalmazható szennyvíz tisztításra) mutatkozik meg, ezért ez a kutatási terület egyre nagyobb figyelmet kap (WEI *et al.*, 2011). Általánosságban a bio-katódokat két csoportba sorolják: aerob és anaerob bio-katódok. Aerob bio-katódok esetén a terminális elektronakceptor az oxigén, míg az anaerob bio-katódok esetén nitrát vagy szulfát vegyületek szolgálnak elektron-akceptorként (BEN LIEW *et al.*, 2014). Jelenleg bio-katódként főleg szén-alapú kompozit anyagokat használnak, hasonlóan az anód anyagokhoz (pl. grafit lapot és granulátumot, vagy rozsdamentes acélt), katalizátor mikroorganizmusként pedig elsősorban kevert kultúrákat, melyek szennyvíztisztító vagy biogáz telepekről származnak (HUANG *et al.*, 2011). A bio-katódok hátránya, hogy a katalízis ebben az esetben biokémiai folyamat, amit számos tényező befolyásolhat, továbbá, hogy a katódtérben a mikrobák számára megfelelő környezetet kell kialakítani (hőmérséklet, pH, tápanyagok, stb.). A bio-katód kialakítások alkalmazására példaként említhető RABAEY és munkatársai (2008) kutatása, melyben abiotikus és biotikus katódok hatását vizsgálták. *Sphingobacterium* fajokat

alkalmazva katód katalizátorként a MÜC maximális fajlagos teljesítménye háromszorosa (49 mW/m^2) volt az abiotikus katódénak (15 mW/m^2).

2.3.3 A mikrobiális üzemanyagcella teljesítménye

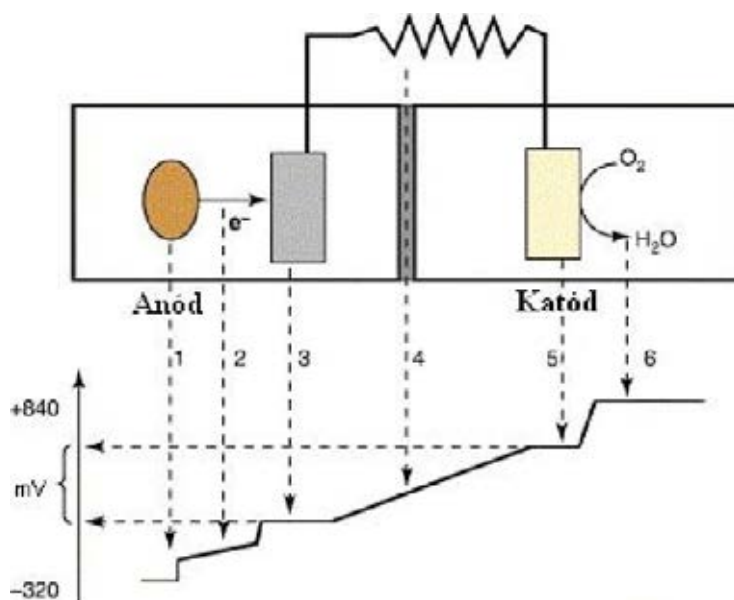
A mikrobiális energiacellában képződő feszültség a rendszerben lévő elektrondonor és -akceptor közti potenciál különbségből adódik. Általánosságban az üzemanyagcellában képződő feszültséget csak csekély mértékben tudjuk befolyásolni, hiszen a szubsztrátumként szolgáló vegyületek a mikroba anyagcseréje során redukált koenzimékké alakulnak (NADH, FADH), így lényegében a maximálisan megtermelhető feszültség független a szubsztrátum minőségétől. Legnagyobb mértékben a katódtérben alkalmazott oxidálószer (levegő, oxigén, káliumpermanganát, stb.) megválasztásával, valamint a cella belső ellenállásának csökkentésével tudjuk befolyásolni a potenciál különbséget.

A mikroba számára rendelkezésre álló elektronakceptortól függően a potenciál különbség nagymértékben megváltozhat az üzemanyagcella-rendszerben. A MÜC anódtérben nem áll rendelkezésre oxigén, így az ott található anód biztosítja a mikroorganizmusok számára a potenciál különbséget a redukált koenzimek regenerálásához (THAUER *et al.*, 1977).

Az elektródokon keresztül az elektron a katódtérbe jut, ahol az oxigénnel egyesülve vízzé alakul. Az 2. táblázatban szereplő potenciálkülönbségek alapján kiszámítható, hogy glükóz alkalmazása esetén a maximálisan kinyerhető feszültség körülbelül $1,2 \text{ V}$ lehet (-320 mV - 840 mV = -1140 mV) (RABAEY és VERSTRAETE, 2005; TORRES *et al.*, 2010).

2. táblázat: Potenciálkülönbségek az egyes redox reakciók során (RABAEY és VERSTRAETE, 2005)

Redox reakció	E'0 (mV)
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{NADH}$	-320
$\text{Citokróm b (Fe}^{3+}) + e^- \rightarrow \text{Citokróm b (Fe}^{2+})$	+75
$\text{Citokróm c (Fe}^{3+}) + e^- \rightarrow \text{Citokróm c (Fe}^{2+})$	+254
$\text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 e^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$	+840
$\text{Fe}^{3+} + e^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$	+772
$\text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 e^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	+433



8. ábra: Potenciálváltozás a mikrobiális üzemanyagcellában
(RABAEY és VERSTRAETE, 2005)

Ez a maximális potenciálkülönbség csak ideális körülmények között érhető el, vagyis ha nem lépnek fel veszteségek és nem folyik áram az anódról a katód felé (üresjárási feszültség). Számos tényező okozhat veszteségeket, amelyek közül néhányat a 8. ábra mutat. A mikrobiális üzemanyagcella belső ellenállása több összetevőből származik:

Legnagyobb befolyással rendelkező tényező a mikroba és az anód közötti elektrontranszfer hatékonysága (1), az elektrolit (2), az anód (3), a szeparátor (4) és a katód (5) ellenállása, valamint az elektronakceptor redukciójának hatékonysága (6). Ha az elektródokon áram folyik, akkor a feszültség tovább csökken, ezért a mikrobiális üzemanyagcella működtetési paramétereit optimalni kell az egyes feladatokhoz (RABAEY és VERSTRAETE, 2005). BOND és LOVLEY (2003) kutatásuk során képesek voltak 0,5 V feszültséget előállítani külső ellenállásra kötött mikrobiális üzemanyagcellával, továbbá MOON és munkatársai (2006), már 0,7 V feszültség értéket is elértek.

Az áramerősséget egy vezető keresztmetszetén egy szekundum alatt áthaladó töltések mennyisége határozza meg, tehát a MÜC áramerőssége az 1 szekundum alatt átadott elektronok mennyiségéből származtatható. Az üzemanyagcella áramerőssége az elektrontranszferben résztvevő mikrobák mennyiségének függvénye. Ez növelhető olyan módszerekkel, amelyek során növelhető a mikrobák egyidejű elektron leadása (pl. mediátorok vagy elektród felület növelése). A szakirodalomban fellelhető publikációk megtevesztőek lehetnek, mivel a kutatók egy része a katódfelületére vonatkoztatják az elektromos áramteremlést, míg mások az anód felületére. Egyes kutatások beszámolnak akár 1000 mA/m^2 anód felületre vonatkoztatott áramerősségről is (LOGAN, 2009). YOU és munkatársai (2006) által közzé tett tanulmányban két-kamrás MÜC rendszerben $2060,19 \text{ mW/m}^3$, míg egykamrás MÜC rendszerben $6817,4 \text{ mW/m}^3$ teljesítményt tudtak elérni.

Ezen eredmények sajnos csak kis elektród felületű cellákban érhetők el. A probléma még mindig a léptéknövelésnél léphet fel.

A MÜC energiaforrásként való alkalmazásához szükséges a cellákat sorba illetve párhuzamosan kötni. Soros kapcsolásnál az egyik cella pozitív pólusát (katód) kötik a másik cella negatív pólusához (anód). Párhuzamos kötésben a különböző cellák anódjait és katódjait kötik össze. Más energiaforrásokhoz hasonlóan a MÜC-ák sorba kapcsolása a feszültség növelését eredményezi, míg párhuzamos kötése az áramerősséget növeli. Párhuzamosan csak azonos feszültségű MÜC-t lehet kötni, ellenkező esetben a kiegyenlítő áramok miatt jelentősen csökken a cellák teljesítménye (GURUNG és OH, 2012). Számos kutatás beszámol a sorba kötött üzemanyagcellák teljesítmény növekedéséről (AELTERMAN *et al.*, 2006; GURUNG *et al.*, 2012; RAHIMNEJAD *et al.*, 2012a). Sorosan kapcsolt üzemanyagcelláknál megfigyelték, ha az összekötés miatt az anód-potenciál nagyobb, mint a katód potenciálja, az egyes cellák anódtér potenciálja ellentétes előjelűvé válik. Ez a jelenség a feszültség reverzió (voltage reversal), ami súlyosan károsíthatja a MÜC elektrogén mikroba kultúráját (WANG *et al.*, 2014).

2.4 A mikrobiális üzemanyagcella mikrobiológiája

2.4.1 Extracelluláris elektronokat termelő anyagcsere folyamatok

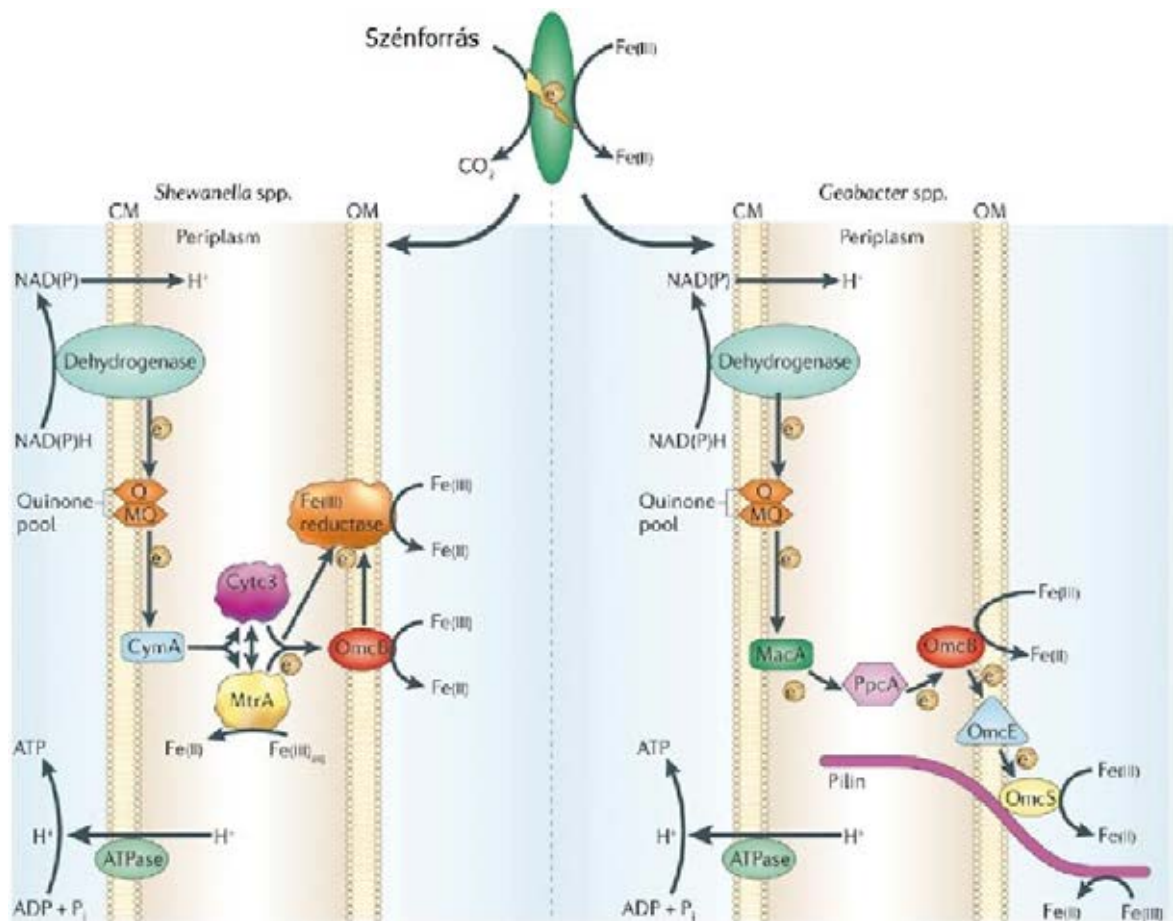
Ahhoz, hogy a mikrobiális energiacella működését teljes mértékben megérthessük, szükséges az alkalmazott mikrobakultúra fiziológiájának átfogó ismerete. Az anyagcsere utak ismeretében BOND és LOVLEY (2003) kutatásaikban megállapították, hogy számos vas(III)-at redukáló baktérium képes közvetlenül, az anaerob anyagcseréje során, különböző anyagú és kialakítású elektródokat használni elektron-akceptorként. Ez annak a megfigyelésnek köszönhető, hogy a vas-redukáló baktériumoknál az elektron átadása a vas(III)-ionoknak megegyezik azzal a folyamattal, amely végbemegy a mikroba és az üzemanyagcella elektródja közt (FENG *et al.*, 2013). Ezért a mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramtermelő folyamatának megismerése céljából érdemes a mikrobiális vas(III)-redukció anyagcsere-folyamatait áttekinteni.

A mikroorganizmus energiatermelő anyagcsere folyamatai során az életműködés szempontjából fontos vegyületek (ATP, NADH, NADPH, stb.) meghatározott sztöchiometriai arányban képződnek, jól lehet a mikroorganizmus egyes életszakaszaiban az igények jelentős minőségi és mennyiségi eltérést mutatnak. Az energiaforrásként szolgáló ATP-képződést a redukálható koenzimek (NAD⁺, FAD⁺) mennyisége egyértelműen meghatározza. Tehát a redukált kofaktorok visszaoxidálhatósága az életben maradás elengedhetetlen feltétele. Ennek a problémának a feloldására különböző alternatív elektrontranszport-rendszerek szolgálnak. Feladatuk a túlélés biztosítása, így közös jellemzőjük a dehidrogénezési folyamatok közben

megjelenő redukált kofaktorok regenerálása, lehetőleg toxikus peroxidok képződése nélkül. Számos példát találunk a mikroszervezetekben az „anaerob légzésnek” nevezett kofaktor-regenerálási folyamat működésére. Elektron-akceptorként szerepelhet anaerob körülmények között a nitrát, illetve a szulfát, valamint bármely redukálható fémion, így a három-értékű vasion is. Ilyen esetben a környezetben fellelhető elektron-akceptorként szolgáló vegyületekre kerül az anyagcsere során képződött „felesleges” elektron (SZENTIRMAI, 1996).

A vas(III)-redukáló baktériumfajok jellemzően obligát vagy fakultatív anaerob mikroorganizmusok. Közös jellemzőjük a széleskörű elektron-akceptor hasznosítási képesség (LENTINI *et al.*, 2012), így a vas(III)-ionok redukálása is. Az elektron-akceptor minőségének függvényében többféle anyagcsere is lejátszódhat.

A vas-redukcióra képes mikroorganizmusok szénhidrátalapú energiatermelő metabolizmusa a glikolízis enzimes reakció-sorozatával veszi kezdetét. A keletkező piruvát dekarboxilezését követően az acetil-koenzimA a Szent-Györgyi-Krebs ciklusba kerül (ESTEVE-NUNEZ *et al.*, 2005; FREDRICKSON *et al.*, 2008). Ezt követően a folyamat során keletkezett redukált koenzimek bekapcsolódnak az elektrontranszport rendszerbe, ami legfőképpen c-típusú citokrómot és menakinont (K₂-vitamin) tartalmaz (GASPARD *et al.*, 1998; LLOYD *et al.*, 1999; SEELIGER *et al.*, 1998).



9. ábra: A *Geobacter* és *Shewanella* fajok Fe³⁺-ionokat használó légzési útjának terminális szakaszai (WEBER *et al.*, 2006)

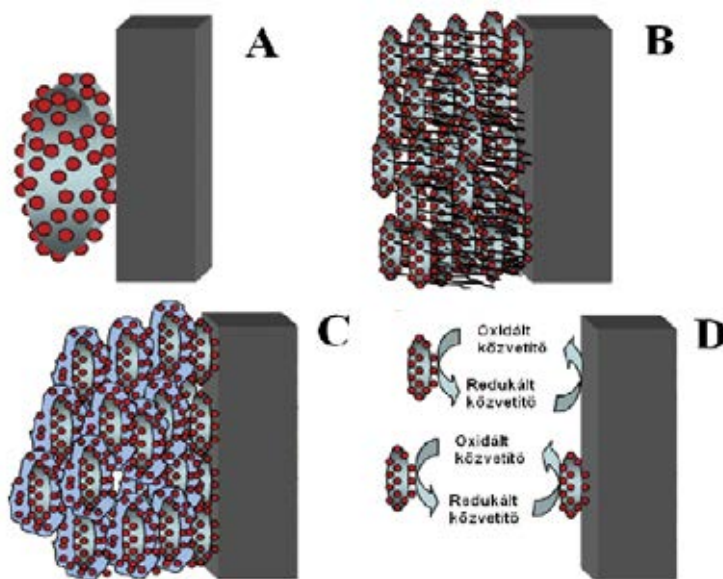
A vas-redukcióra képes mikroorganizmusok számos sejtfunkciója, mint a légzési elektron lánc is a citoplazma membránhoz kötődve működik. Oldható elektron-akceptorok, mint az oxigén molekula vagy a nitrát vegyületek, passzív diffúzió révén jutnak a sejtbe. Semleges körüli pH-n azonban a Fe(III) rosszul oldódik vízben, így nem képes a sejtbe diffundálni. A Gram-negatív baktériumoknak a vas(III) vegyületek redukációjához valamiképpen át kell hidalniuk az oldhatatlan fémionok és a citoplazma membrán elektrontranszport rendszere közti távolságot (LUU és RAMSAY, 2003). *Shewanella putrefaciens* MR-1 törzs vizsgálata során megfigyeltek c-típusú citokróm vegyületeket a mikroba külső membránjába ágyazva, melynek köszönhetően képes potenciális kapcsolatot létrehozni a nem oldatban lévő Fe(III) vegyületekkel. (BELIAEV *et al.*, 2001; MYERS és MYERS, 1992, 1997) (9.ábra). Jól mutatja a membránba ágyazott c-típusú citokróm szerepét, hogy abban az esetben, amikor a *Shewanella putrefaciens* aerob körülmények között lett szaporítva, a citoplazma membrán citokróm tartalma nagy volt, míg anaerob környezetben inokulált tenyészet esetén, megközelítőleg a citokróm tartalom 80%-a a külső membránban helyezkedett el (MYERS és MYERS, 1992). Anaerob tenyészetek esetén megfigyelhető volt jelentős mennyiségű periplazmás citokróm, ami összeköttetésként szolgálhat a citoplazma membrán és a külső membrán elektron-transzport rendszerek között. Különböző

kutatások beszámoltak *Shewanella putrefaciens* törzsek külső membránjának vas(III)-reduktáz aktivitásáról, azonban ez az enzimaktivitás csak az anaerob körülmények között tenyésztett sejtek esetében volt megfigyelhető. GASPARD és munkatársai (1998) *Geobacter sulfurreducens* esetében is megfigyelték a vas(III)-reduktáz aktivitást a különböző membrán frakciókban, legfőképpen a külső membrán frakcióban. MAGNUSON és munkatársai (2000; 2001) szerint feltételezhetően ez a reduktáz-komplex c-típusú citokrómot tartalmaz és NADH koenzimre van szüksége a működéshez. Ez az enzim-komplex képes re-oxidálni Fe(III) jelenlétében a lebontást során keletkező redukált koenzimeket (NADH, NADPH és ferredoxin). Ez szintén arra utal, hogy ez csatornaként szolgál a belső elektron-rendszer és a külvilág között.

2.4.2 Az elektrontranszfer módjai

A mikroorganizmusok a szubsztrátumok lebontása során keletkező elektronokat a sejtfalukon kívülre juttatják. A mikroba azonban morfológiájától függően többféleképpen is eljuttathatja az elektródhoz az extracelluláris elektronokat.

Az elektrontranszfer módjait a sejtekről az elektród felületére a 10. ábra szemlélteti.



10. ábra: Elektronátadás módjai a mikrobasejt és az elektród közt
(LOVLEY, 2008)

A legegyszerűbb elektronátadási mód (10. ábra, A) amikor a mikroba közvetlenül az elektródnak adja át az elektronját a külső membránjában lévő c-típusú citokróm fehérje segítségével. Ez a típusú elektrontranszport lehetővé teszi az üzemanyagcella kialakítását, viszont nehézkessé teszi az áramerősség növelését, mivel legfeljebb egy sejtsornyi réteg tud kialakulni az elektród felületén.

Számos elektrogén mikroorganizmus rendelkezik olyan sejt-organellumokkal, melyek segítségével képes az extracelluláris elektronjait akár nagy távolságokra (1-2 μm) is eljuttatni (10. ábra, B). Ezeket a sejtszerveket elektro-konduktív pólusoknak vagy nano-drótoknak (angolul nano-wire) nevezik, melyek fehérje természetük ellenére jó elektromos vezetőképességgel rendelkeznek. A konduktív pólusok lehetővé teszik, hogy a mikrobák több rétegű biofilmet képezzenek, mivel nem csak közvetlenül az elektródhoz kapcsolt mikrobák képesek megszabadulni elektronjaiktól, hanem a távolabbi rétegek sejtjei is. Ez jelentősen megnövelheti a MÜC áramtermelését, teljesítményét és hatékonyságát.

A jellemző transzport folyamat az (10. ábra, C), ahol a biofilmet képző mikrobák c-típusú citokróm fehérjékben gazdag tokanyagot képeznek. A konduktív tokanyag közvetíti az elektronokat az elektródra. Az elektrontranszportnak ez a módja szintén lehetővé teszi, hogy nagyobb számú mikroba tudjon egy időben elektronokat leadni, így növelve az elektromos áramot és a cella teljesítményét. A túlzott tokanyag termelés azonban meggátolhatja a mikroba tápanyag ellátását.

A mikrobiális üzemanyagcella szempontjából kiemelt jelentőségűek azok a törzsek (10. ábra, D), melyek képesek elektronközvetítő vegyület segítségével létrehozni az elektronátadást. Ebben az esetben nem szükséges, hogy a mikroorganizmus közvetlenül az elektródhoz csatlakozzon, ami megnövelheti az üzemanyagcella flexibilitását. A közvetítő vagy más néven mediátor lehet a mikroba által termelt vegyület (pl. piocianin vagy flavin vegyületek) (BRUTINEL és GRALNICK, 2012; VELASQUEZ-ORTA *et al.*, 2011) vagy alkalmazhatunk mesterséges mediátorokat (metilén-kék, metil-vörös, rezazurin, stb.) (BABANOVA *et al.*, 2011), melyek hatásosabb elektronátadást eredményeznek, azonban számos negatív tulajdonsággal is rendelkeznek (LOVLEY, 2008).

2.5 Biofilm képzés a mikrobiális üzemanyagcellában

A biofilmek, olyan különböző felületeken kialakult mikroba közösségek, melyek a maguk által képzett extracelluláris poliszacharidba (EPS) ágyazódtak. Általánosan elfogadott elmélet szerint a biofilm szerkezetek kialakulása három részre osztható: kezdeti megtapadás, biofilm érése és leszakadás a felületről. Az EPS fizikailag immobilizálja a baktérium sejteket, miközben lehetőséget biztosít a sejt-sejt kontaktus kialakítására és a kommunikációra (READ *et al.*, 2010). A mikrobiális üzemanyagcellák esetében a biofilmeknek elektromosan vezetőképes anyagokból kell létrejönniük, hiszen a biofilm külső rétegeiben lévő sejtek nem lennének képesek átadni elektronjaikat az anódnak.

Több kutatómunka is beszámolt a mikrobiális üzemanyagcella anódján kialakuló biofilmek elektromos áramtermelésre gyakorolt jelentős hatásáról, azonban a legnagyobb ismeretanyag a *Geobacter sulfurreducens* biofilm- és vezetőképes pólus képzéséről áll rendelkezésre (LOVLEY *et al.*, 2011). Reguera és munkatársai (2006) *Geobacter sulfurreducens* MÜC-ben kialakuló biofilmeit vizsgálták. A mikroba által képzett biofilm többrétegben alakult ki a MÜC elektródján. A sejtek az anódtól távolabbi rétegekben is életképesek maradtak és a biofilm vastagságának növekedésével nem csökkent a képzett elektromos áram mennyisége, így feltételezhető, hogy a biofilm megfelelő elektromos vezetőképeséssel rendelkezett.

2.6 Mikrobiális üzemanyagcellában alkalmazott mikrobák

A baktériumok számos vegyületet képesek elektron-akceptorként hasznosítani, azonban a mikrobiális üzemanyagcella szempontjából azok a mikrobák jelentősek, amelyek képesek elektronokat juttatni a sejt falukon kívülre. Ezeket a mikrobákat a szakirodalom exo-elektrogén (exoelectrogenes) mikroorganizmusnak nevezi. Ezeknek a mikrobáknak a közös jellemzőjük, hogy képesek oxigén jelenléte nélkül is életben maradni és szaporodni (anaerobok és fakultatív anaerobok), valamint képesek az anyagcseréjük során képződött elektronfelesleget mesterséges indukció nélkül (mediátorok) a sejt falukon keresztül a környezetbe juttatni. Ez történhet konduktív pólusok, a mikroba által termelt tokanyagok vagy saját maguk által létrehozott mediátorok segítségével. Számos kutatás állította középpontjába az elektrokonduktív pólusok termelésének növelését, emellett az energiatermelésen túl, a kutatók más területeken is felvetítik a sejtorganellek potenciális alkalmazását (pl. miniatűr elektromos eszközök) (REGUERA *et al.*, 2005).

Előnyt jelenthet, ha a mikroba sejtek jól tudnak tapadni különböző elektródok felületéhez, így biztosítva a gyors és hatékony elektronátadást, valamint képesek biofilmet képezni, hogy több rétegni mikrobátömeg tudjon részt venni az elektromos áramtermelésben.

Az MÜC-ben való alkalmazás megkívánja, hogy az felhasználni kívánt mikroorganizmus könnyen szaporítható legyen, ilyen szempontból a fakultatív anaerob anyagcseréjű törzsek előnyösebbek az obligát anaeroboknál, mivel az aerob tenyésztés jelentősen szűkítheti az inokulálás idejét.

A szennyvíz-alapon működő MÜC kialakítások esetében, további kritériumok fogalmazhatók meg az alkalmazandó mikrobával szemben: pl. széleskörű szubsztrátum hasznosítási képessége, az anyagcsere gyorsasága és a hasznosítás határfoka. Egyes mikroba törzsek képesek a környezet számára toxikus vegyületeket is degradálni és szén- vagy nitrogénforrásként hasznosítani. Jó példa erre a *Geobacter toluenoxydans* mikroba, amely különböző

heterociklusos vegyületeket bont le és asszimilál (KUNAPULI *et al.*, 2010). Ezt a képességet kihasználva bioremediáció végrehajtására is alkalmassá teszi a MÜC technológiát.

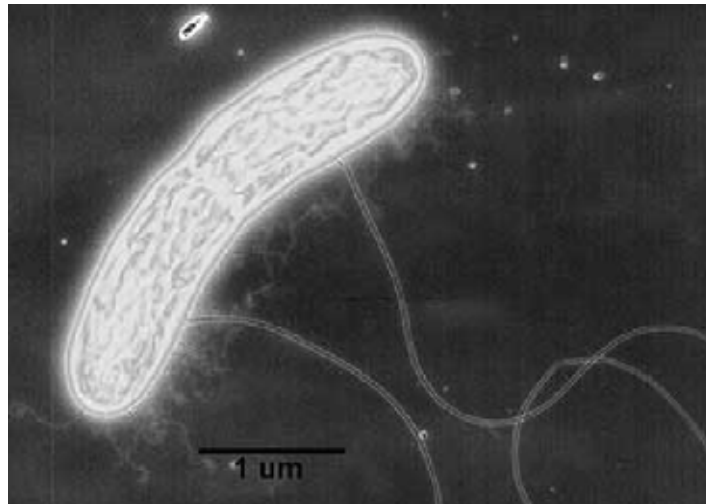
Számos törekvés irányult az elektrogén mikroorganizmusok anyagcsere sebességének növelésére és ezáltal az elektromos áram kihozatalának fokozására. Itt elsősorban géntechnológiai beavatkozások segítségével hoztak létre gyorsmetabolizmusú mutánsokat (IZALLALEN *et al.*, 2008).

Általában a fent említett kritériumoknak csak néhány mikroorganizmus felel meg hiánytalanul. Ennek ellenére számos mikrobiális üzemanyagcellát működtettek már nem elektrogén kultúrával. A 3. táblázatban több mikrobatorzs is felsorolásra került azonban mediátor nélküli rendszerben csak néhány mikroba alkalmazható hatékonyan. Jelenleg mediátor nélküli üzemanyagcella rendszerekben elsősorban *Geobacter* (*G. sulfurreducens*, *G. metallireducens*, *G. lovley*, *G. hygrophillus*, stb.) és *Shewanella* (*S. putrefaciens*, *S. oneidensis*, *S. algae*, *S. baltica*, stb.) fajokat alkalmaznak tiszta tenyészetben (FRANKS és NEVIN, 2010), de gyakran kevert kultúrákat és különböző szennyvíztisztítási folyamat során kialakult mikroba közösségeket is használnak biokatalizátorként. Ritkább esetben élesztő törzseket is felhasználnak (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala*, stb.) (SAYED *et al.*, 2012), azonban az élesztők lassabb anyagcseréje és az elektronátadás nehézségei miatt csak kivételes esetekben indokolt a használatuk.

3. táblázat: Mikrobiális üzemanyagcellákban alkalmazott mikrobák (REDDY *et al.*, 2010)

Mikrobák	Szubsztrátum	Alkalmazás
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Glükóz	Metil-vörös vagy tionin mediátorral
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Acetát	Mediátor nélküli MÜC
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Glükóz	MÜC közösségből izolálva
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Glükóz	MÜC közösségből izolálva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Keményítő, glükóz	MÜC közösségből izolálva
<i>Clostridium beijerinckii</i>	Keményítő, glükóz, laktóz	MÜC közösségből izolálva
<i>Clostridium butyricum</i>	Keményítő, glükóz, laktóz	Szulfát/szulfid mediátorral
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Szacharóz	Vas-kelát komplex mediátorral
<i>Erwinia dissolven</i>	Glükóz	Vas-kelát komplex mediátorral
<i>Escherichia coli</i>	Glükóz, szacharóz	Metilén-kék mediátorral
<i>Geobacter metallireducens</i>	Acetát	Mediátor nélküli MÜC
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Acetát	Mediátor nélküli MÜC
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Glükóz	Rezazurin vagy tionin mediátorral
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Glükóz	Mangán-oxid mediátorral
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glükóz	Vas-kelát komplex mediátorral
<i>Proteus mirabilis</i>	Glükóz	Tionin mediátorral Piocianin és fenazin-karboxamid mediátorral
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glükóz	Mediátor nélküli MÜC
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	Glükóz, tejsav, xilóz	Antrakinnon-diszulfonát mediátorral
<i>Shewanella oneidensis</i>	Glükóz	Mediátor nélküli MÜC
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Glükóz, tejsav, xilóz	Vas-kelát komplex mediátorral
<i>Streptococcus lactis</i>	Glükóz	

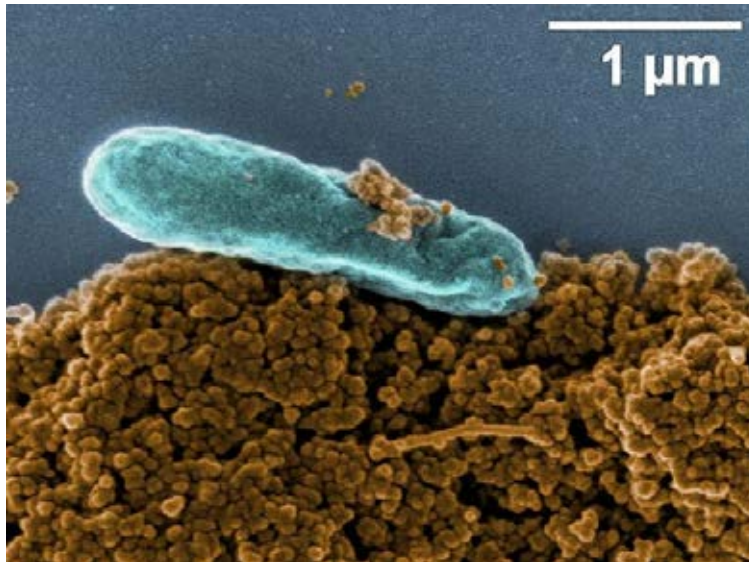
A *Geobacter* genus a proteobaktetek azon csoportja, amelyik obligát anaerob légzésű mikroorganizmusokból áll, valamint potenciálisan alkalmazhatók bioremediációs feladatok ellátására (CACCAVO *et al.*, 1994). A legtöbb *Geobacter* fajt mélytengeri üledékből izolálták, így jól viselik az ott uralkodó környezeti feltételeket. A *Geobacter* fajok közül kerültek ki az első mikrobák, amelyek alkalmasnak bizonyultak a környezetre ártalmas anyagok semlegesítésére, így olyan szerves anyagokéra, mint a petróleum vagy különböző radioaktív fémek. Elektron-akceptorként való hasznosítási tulajdonságuknak köszönhetően *Geobacter* fajokat széles körűen alkalmaznak mikrobiális üzemanyagcella rendszerekben, és az eddigi legnagyobb fajlagos elektromos áram mennyiséget *G. sulfurreducens* (1143 mA/m²) (BOND és LOVLEY, 2003) esetében érték el. A mikrobiális elektromos áramtermelés tekintetben a legtöbb kutatás a *Geobacter*-ek elektron-láncának felderítésére irányult. Elsőként a *G. sulfurreducens* esetében fedeztek fel konduktív pilusokat a mikroba számára hasznos hosszú távú elektron-közvetítés elősegítésére, valamint a elektromosan vezetőképes biofilmet, ami fontos feltétele a nagyhatékonyságú MÜC rendszerek kialakításának (SHARMA és KUNDU, 2010).



11. ábra: A *Geobacter metallireducens* elektronmikroszkópos képe (LOVLEY, 2012)

Shewanella fajok mikrobiális üzemanyagcellákban való alkalmazásáról számos tanulmány beszámolt. A leggyakrabban a *S. putrefaciens*-t és a *S. oneidensis*-t (12. ábra) használták az üzemanyagcellák bio-katalizátoraként (BIFFINGER *et al.*, 2008; MANOHAR *et al.*, 2008). Közös jellemzőjük, hogy Gram-negatív tengeri baktériumok fakultatív anaerob anyagcserét folytatnak és rendelkeznek vas- és mangán-redukációs metabolizmussal, tehát képesek vas- és mangán-ionokat terminális elektron-akceptoroként hasznosítani. A *Shewanella* nemzetség tagjai gyorsan szaporodnak szilárd és folyadék tápközegekben egyaránt.

KIM és munkatársai (2002) kutatómunkájuk során *S. putrefaciens* törzseket alkalmaztak mediátor nélküli mikrobiális üzemanyagcellában és vizsgálták a különböző törzsek közvetlen elektronátadó képességét a mikrobacél és az üzemanyagcella elektródja között. A kutatás során megfigyelték, hogy az anaerob körülmények között inokulált *S. putrefaciens* sejtek elektrokémiailag aktívnak mutatkoztak, míg ez az aktivitás nem volt megfigyelhető az aerob módon tenyésztett sejtek esetében. További előnyt jelent a jelentős extracelluláris elektron-közvetítő képzési képesség, amit számos *Shewanella* faj esetében megfigyeltek (BRUTINEL és GRALNICK, 2012).



12. ábra: A *Shewanella oneidensis* elektronmikroszkópos képe (RODEN *et al.*, 2010)

Mikrobiális üzemanyagcella bio-katalizátoraként *Pseudomonas* fajokat is sikerrel alkalmaztak. Az eddigi legeredményesebb *Pseudomonas* faj a *P. aeruginosa* volt. Ez a baktérium a Gram-negatív, aerob, pálcá alakú mikroorganizmusok közé tartozik. HABERMANN és POMMER (1991) alkalmazták először ezt a fajt mikrobiális üzemanyagcellában. Kutatásuk során létrehoztak egy alacsony költségű üzemanyagcella rendszert, amely hosszú távon is stabilan működött megfelelő hatékonysággal. RABAEY és munkatársai (2005a) tanulmányukban bemutattak egy mediátor hozzáadása nélküli MÜC rendszert, valamint a cella anolitjában kimutattak a kultúra által termelt (endogén) kémiai mediátorokat (például piocianint). Az tápközegbe nagymennyiségben elsőként szekretált redox-mediátorokat létrehozó kevert kultúra elsődlegesen *P. aeruginosa* törzseket tartalmazott, így továbbra is alkalmazzák az elektrogén kultúrákban kiegészítő mikroorganizmusként (SHARMA és KUNDU, 2010).

2.7 Mikroba-szelektáló módszerek MÜC alkalmazásra

A mikrobák anyagcseréje még nemzetségen belül is nagymértékben különbözhet, így lényeges, hogy milyen mikrobákat vagy mikroba közösségeket alkalmazunk MÜC rendszerünkben. Szükségessé vált tehát olyan gyors módszerek kifejlesztése, melyek segítségével a különböző mikroorganizmusok elektromos áramtermelő képességét össze lehet hasonlítani különböző szubsztrátum molekulák esetében. A gyors módszerek előnye az üzemanyagcellával való szűréssel szemben, hogy a mérések számát nem korlátozza a rendelkezésre álló üzemanyagcellák mennyisége, valamint a kisebb reakcióterület intenzívebb anyagcserét eredményez, így az egyensúlyok hamarabb képesek kialakulni és a folyamatok végbemenni. Néhány módszer már ismert az elektrogén mikroorganizmusok elektrokémiai szkrinelésére. Ezek a módszerek működési elvük szerint három csoportba sorolhatók.

Az egyik módszercsoport alapja, hogy a mikrobiális üzemanyagcellák méretének csökkentésével kívánják elérni, hogy olcsó és gyors eszközt tudjanak létrehozni. RINGEISEN és munkatársai (2006) olyan mikro-MÜC rendszert hoztak létre, ahol az anódtér hasznos térfogata megközelítőleg 1,2 ml volt, ami egy nagyságrenddel kisebb, mint a korábbi alkalmazott MÜC rendszerek anódtere. További méretcsökkentést ért el CAO és kutatócsoportja (2009) a Quickscreen nevű eszközzel, ahol az anódtér térfogata egy nagyságrenddel kisebb (200 μ l), mint a korábbi miniaturizált MÜC-rendszerek. Hasonló elven működik HOU és kutatócsoportja (2009) által létrehozott rendszer, ami egy MÜC mátrixból tevődik össze. A mátrixnak egy 24-férőhelyes microplate lemez képezi az alapját, amelybe beágyazták az anód és katód egységeket, így 24 egymástól független mini-MÜC-öt hozva létre. Egy cella hasznos térfogata 150 μ l. Ezeknek a konstrukcióknak a kis méretük miatt kisebb az anyagigényük, így olcsóbbak, valamint az elektrokémiai egyensúlyok és a biofilm réteg is hamarabb kialakul, mint nagyobb üzemanyagcella rendszerek esetében.

A másik módszercsoport a mikrobák elektronátadó-képességét használja ki, azonban nem az üzemanyagcella elektródjának, hanem egy másik anyagnak, aminek a mennyiségét szelektíven nyomon lehet követni. A szakirodalomban csak néhány ilyen módszer ismert. A legelterjedtebb a volfrám-oxid nano-klaszter próba (YUAN *et al.*, 2013). A módszer azon alapszik, hogy a mikrobák a szubsztrátumok oxidálása révén nyert elektronokat a volfrám-oxid részecskének adják át, amelyek ennek hatására megváltoztatják színüket, így fotometriásan követhető a változás. A módszer előnye, hogy rendkívül gyors, akár néhány perc alatt is észlelhető a változás. A hátránya, hogy nehezen alkalmazható mennyiségi meghatározásra és a volfrám-oxid kolloid nehezen beszerezhető.

Számos kutatás számol be arról a jelenségről, hogy a vasredukáló baktériumoknál az elektron átadása a vas(III) ionoknak megegyezik azzal a folyamattal, amikor a mikroba az üzemanyagcella elektródjának közvetíti az anyagcseréből származó elektronjait (FENG *et al.*, 2013). A tanszéken folyó kutatások ezt a feltevést megerősítették (SZÖLLŐSI *et al.*, 2015b).

Kutatók számára kedvelt a különböző elektrokémiai módszerek alkalmazása, mely során a mikroorganizmus elektrogén képességeit vizsgálják. A mikrobiális üzemanyagcellák esetében leggyakrabban ciklikus voltammetriai módszert alkalmaznak, mivel ez a módszer gyors és megbízható lehetőséget nyújt a mikrobák mediátor termelésének, valamint közvetlen elektrontranszfer képességének kimutatására. A módszer hátránya, hogy többnyire kvalitatív információ kinyerésére alkalmas, így a mikrobák más elven működő módszerekkel való további tesztelése szükséges.

2.8 A mikrobiális üzemanyagcella alkalmazási lehetőségei

A mikrobiális üzemanyagcellák hasznukat tekintve kettős tulajdonságúak. Egyrészt elektromos áramot termelnek szerves anyagok felhasználásával, másrészt a tápoldat biológiailag aktív anyag tartalmát csökkentik.

A 1995. évi LIII. törvény értelmében csak a megadott határértékeknek megfelelő szennyvíz kerülhet a csatornába, így az ipar köteles a szennyvizeit ártalmatlanítani. A modern biotechnológia számos megoldást ismer és alkalmaz a szennyvizek ártalmatlanítására és egyes esetekben energia visszanyerésre. Az iparban leginkább eleveniszapos technikát alkalmaznak szennyvíztisztításra, amely során a biológiailag lebontható anyagokat tartalmazó szennyvizet kevert baktérium és gomba kultúrával hozzák kapcsolatba, ami oxigén jelenlétében a szerves anyagok jelentős részét lebontja. Ennek a szennyvíztisztítási módnak nagyon kedvező a tisztítási hatásfoka, azonban a levegőztetés miatt költséges. További megoldást jelenthet a szennyvizek anaerob rothasztása metanogén baktériumokkal, mely során a szerves anyagból biogáz képezhető. A biogázt ezt követően fűtésre vagy elektromos áram képzésre is használhatják.

A mikrobiális üzemanyagcellák szennyvíz tisztítási célokra való alkalmazása mellett számos érv szól. Anaerob működésük miatt nem igényelnek levegőztetést, ami jelentősen csökkenti a technológia költségeit, valamint működésük közben közvetlenül hozzák létre az elektromos áramot, míg biogáz esetében a szennyvízből nem közvetlenül keletkezik az elektromos áram, hanem több technológiai lépésen kell keresztül mennie az anyagoknak, ami veszteségekkel jár. Míg a biogáz esetében 1 kg degradálható szerves anyagból 1 kWh elektromos áram termelhető, addig MŰC esetében elméletileg 3 kWh energia termelhető (RABAEY *et al.*, 2005b). Ezáltal gazdaságosabbá válhat a szennyvíztisztítás és legalább a szennyvíztelep áramellátását fedezheti az üzemanyagcella termelte áram. A folytonosan és fél-folytonosan működtetett üzemanyagcellák akár hónapokon keresztül is képesek megbízhatóan üzemelni (MOHAN *et al.*, 2008), ami tovább növelheti a technológia versenyképességét. A keletkezett nagy mennyiségű sejtömeget kizárítva biomassza kazánokban elégetve további hőenergiához juthatunk.

Az idáig kutatott mikrobiális üzemanyagcellák elsősorban glükózban gazdag szennyvizek ártalmatlanítására alkalmasak, ami a későbbiekben változhat a benne felhasználni kívánt újabb mikroba kultúrák számának növelésével. Glükózban gazdag szennyvízzel elsősorban a söriparban és a komplex kukorica feldolgozás során találkozhatunk (LOGAN, 2008). Félüzemi méretű mikrobiális üzemanyagcellát hoztak létre az Amerikai Egyesült Államokban Oakville-ben (California) is, ahol borászati szennyvíz tisztítását kívánták ezzel a technológiával megoldani. Az 1 m³-es reaktor, összesen 24 modulból és 144 elektródból áll. A 100 napos teszt során 7,4 A/m³ fajlagos elektromos áramtermeléssel üzemelt és az elbontható anyagok körülbelül 62%-át hasznosította (CUSICK *et al.*, 2011).



13. ábra: A Queensland-i félüzemi méretű mikrobiális üzemanyagcella (LOVLEY, 2006b)

Egyes speciális mikrobiális energiacella rendszerek alkalmazhatók bio-szenzorként is bizonyos feladatok ellátására. Ilyen értelemben MÜC alapú bio-szenzorokat alkalmaznak toxikus anyagok kimutatására, miszerint a mikroba szaporodást gátló anyagok jelenlétében a termelt elektromos áram mennyisége is csökken. A szenzorok elektródjának felületére mikrobákat rögzítenek, és egy membránnal védik őket. A membránon átdiffundáló toxikus anyagok jelenléte potenciál változást okoz, ami nagyon pontosan mérhető (RABAEY *et al.*, 2005b).

Áramforrásként mikrobiális üzemanyagcellák elsősorban a nehezen megközelíthető vagy az infrastruktúrától távol eső helyeken alkalmazhatók eredményesen. Így például a tengeri kutatások során bójákba vagy a mederbe telepíthetik az üzemanyagcellát, ezáltal elektromos energiával láthatják el az alacsony fogyasztású mérőműszereket (meteorológiai mérőműszereket, szondákat, érzékelőket, stb.), melyek távol esnek az egyéb áramforrásoktól (LOVLEY, 2006a).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Felhasznált mikroorganizmusok

A kutatásaimban különböző mikroorganizmusokat alkalmaztam, amelyeknek egy része a Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (DSMZ) törzsgyűjteményből került megvételre.

Alkalmazott *Geobacter* fajok:

- *Geobacter sulfurreducens*, DSMZ 12127,
- *Geobacter toluenoxydans*, DSMZ 19350,
- *Geobacter metallireducens*, DSMZ 7210.

Alkalmazott *Shewanella* fajok:

- *Shewanella algae*, DSMZ 9167,
- *Shewanella xiamenensis*, DSMZ 22215,
- *Shewanella japonica*, DSMZ 15915,
- *Shewanella woodyi*, DSMZ 12036.

A *Saccharomyces cerevisiae* WS-120 törzs a Weihenstephan-i Egyetem élesztőgyűjteményéből származott (Hefebank Weihenstephan, TUM, Freising, Németország).

A *Lactobacillus plantarum* 2142 törzset és az *Escherichia coli* ATCC 8739 törzset a Perugia-i Egyetem (Perugia, Olaszország) bocsájtotta rendelkezésemre.

4.2 Alkalmazott tápközegek

Luria-Bertrani tápközeg (LB)

Tripton	10 g
Élesztő kivonat	5 g
NaCl	10 g
Desztillált víz	1000 ml-re.

Az összetevőket táramérleggel bemértem az edénybe és feloldottam a desztillált vízben. A pH ellenőrzés után (pH~ 7) 121°C-on 15 percig sterilizáltam.

Marine tápagar (DSMZ 514)

Pepton	5 g
Élesztő kivonat	1 g
Fe(III)-citrát	0,1 g
NaCl	19,4 g
MgCl ₂	5,9 g
Na ₂ SO ₄	3,24 g
CaCl ₂	1,8 g
KCl	0,55 g
NaHCO ₃	0,16 g
KBr	0,08 g
SrCl ₂	34 mg
H ₃ BO ₃	22 mg
Na-szilikát	4 mg
NaF	2,4 mg
(NH ₄) ₂ NO ₃	1,6 mg
Na ₂ HPO ₄	8 mg
Agar	15 g
Desztillált víz	1000 ml-re.

Az összetevőket feloldottam a desztillált vízben és beállítottam pH~7-re, majd 121 °C-on 15 percig steriliztem.

Geobacter tápközeg I. (DSMZ 826)

NH ₄ Cl	1,5 g
Na ₂ HPO ₄	0,6 g
KCl	0,1 g
Na-acetát	0,82 g
Na-fumarát	8 g
Nyomelem oldat	10 ml
Vitamin oldat	10 ml
Rezazurin	0,5 mg
Na ₂ -fumarát	8 g
NaHCO ₃	2,5 g
Desztillált víz	1000 ml-re.

Az elkészítésnél a Na-fumarát, a NaHCO₃ és a vitamin oldat kivételével először a komponenseket oldottam fel a desztillált vízben. Ezután felforraltam és hozzáadtam a NaHCO₃-ot. A tápközeg pH-ját 6,8-ra állítottam, majd N₂ gázzal átbuborékolattam. Ezt követte a sterilizés 121°C-on 15 percig. A Na-fumarátot és a vitaminoldatot szűréssel külön steriliztem majd hozzáadtam a tápközeghez.

Geobacter tápközeg II. (DSMZ 579)

Fe(III)-citrát	13,7 g
NaHCO ₃	2,5 g
NH ₄ Cl	1,5 g
NaH ₂ PO ₄	0,6 g
KCl	0,1 g
Na-acetát	2,5 g
Vitamin oldat	10 ml
Nyomelem oldat	10 ml
Desztillált víz	1000 ml-re.

A Fe(III)-citrátot kimértem egy 2000 ml-es edénybe és hozzáadtam kb. 800 ml desztillált vizet, majd folytonos kevertetés és melegítés mellett feloldottam. Az oldódást követően visszahűtöttem szobahőmérsékletre és hozzáadtam a többi komponenst (a vitamin oldat kivételével). Ezt követően beállítottam a pH-ját 6,8-ra és steriliztem 121°C-on 15 percig. A lehűlt tápközeghez hozzáadtam a steril vitamin oldatot, amelyet mikroszűréssel steriliztem.

Nyomelem oldat (DSMZ 141)

Nitrilo-triecsav	1,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,18 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01 g
KAl(SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,03 g
Desztillált víz	1000 ml-re.
pH=7-re állítani KOH-dal,	

Vitamin oldat (DSMZ 141)

Biotin	2 mg
Folsav	2 mg
Piridoxin-HCl	10 mg
Tiamin-HCl · 2 H ₂ O	5 mg
Riboflavin	5 mg
Nikotinsav	5 mg
D-Ca-pantotenát	5 mg
B ₁₂ vitamin	0,1 mg
p-aminobenzoésav	5 mg
Liponsav	5 mg
Desztillált víz	1000 ml-re.

A feloldást követően 0,25 µm-es pórus méretű szűrővel steriliztem.

Y(E)PD tápközeg

Élesztő kivonat	10 g
Pepton	20 g
Glükóz	20 g
Desztillált víz	1000 ml-re.

Az összetevőket feloldottam a desztillált vízben és ellenőriztem a pH-t (pH~7). Majd 121°C-on 15 percig steriliztem.

Minimál tápközeg

NaCl	6 g
KCl	0,1 g
NH ₄ Cl	0,25 g
Na ₂ HPO ₄	12 g
NaH ₂ PO ₄	2,57 g
Desztillált víz	1000 ml-re.

Az összetevőket feloldottam a desztillált vízben, majd kiegészítettem a szénforrással (glükóz, galaktóz, maltóz, laktóz, maltodextrin) 1 g/l koncentrációban és a pH-t 7-re állítottam. Sterilizés 121°C-on 15 percig történt.

A *Shewanella* és *Escherichia coli* törzsek tenyésztéséhez és fenntartásához Luria-Bertani tápközegét és Marine tápagart alkalmaztam.

A *Geobacter* baktrériumok szaporításához és fenntartásához *Geobacter* tápközegeket használtam (*G. sulfurreducens* faj esetén a *Geobacter* tápközeg I., *G. toluenoxydans* és *G. metallireducens* esetekben a *Geobacter* tápközeg II.)

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztő szaporításához, fenntartásához és vizsgálataihoz Y(E)PD tápközegét alkalmaztam.

Az asszimilációs kísérletekhez Minimál tápközegét használtam, ami nem tartalmazott szerves nitrogén- és szén-forrást, csak a vizsgálni kívánt szénhidrátot (glükóz, galaktóz, maltóz, laktóz és maltodextrin).

4.3 Vizsgálatok, módszerek

4.3.1 Szaporodás kinetikai vizsgálatok

A szaporodás kinetikai vizsgálatoknál a megfelelő tápközegbe oltottam a vizsgálandó mikrobákat. A tenyésztés során időközönként mintát vettem és megmértem az optikai denzitását

600 nm-es fényhullámhosszon spektrofotométerrel. A sejtszámokat a kalibrációs görbe alapján számoltam ki. Azt követően szerkesztettem a szaporodási görbét és megállapítottam a szaporodási fázisokat. A kapott szaporodási görbék exponenciális szakaszaira egyenest illesztettem, amelyből kiszámítottam a maximális fajlagos szaporodási sebességet.

Kalibrációs görbe elkészítése: a mikroorganizmust tartalmazó tenyészetből hígítási sorozatot készítettem, majd mindegyik hígításitágból meghatároztam a sejtszámot lemezöntéssel. Ezután megszerkesztettem a kalibrációs görbét az OD₆₀₀ és sejtkoncentráció összefüggés alapján. A spektrofotometriás mérések feltétele, hogy az OD₆₀₀ érték 0,100 - 0,800 között legyen, ezért szükség esetén a mintát hígítottam. Vas(III)-citrát tartalmú tápközegek esetén csak lemezöntéssel követtem nyomon a tenyészet sejtszámát.

4.3.2 Szubsztrátum hasznosítási vizsgálatok

A szubsztrátum-hasznosítási vizsgálatoknál a baktérium kultúrát a szerves szén- és nitrogénforrásoktól mentes minimál tápközegbe oltottam, amit a vizsgálandó szubsztrátummal egészítettem ki. Azt követően, megvizsgáltam a mikroba szaporodási és/vagy vas(III)-redukciós tulajdonságait az OD_{600nm} és/vagy 460 nm-es hullámhosszon mért abszorbancia változásával.

4.3.3 Mikrobiális vas(III)-redukció vizsgálata

A mikrobiális vas-redukció vizsgálatához a Fe³⁺-ion koncentráció változását követtem nyomon. Az alkalmazott tápközegek 5 g/l-es koncentrációban tartalmaztak vas(III)-citrát molekulákat. Vas(III)-ionok mennyiségének változását ammónium-rodanidos (NH₄SCN) módszerrel követtem nyomon, amelyet széles körben alkalmaznak a talajminták és szennyvizek vastartalmának meghatározására (MSZ 318-14:1987). A módszer azon alapul, hogy az ammónium-rodanid savas közegben a vas(III)-ionokkal sötétvörös komplexet képez, amely fotometriásan jól mérhető. A 100 µl térfogatú mintákat először 900 µl tömény kénsavval savanyítottam (pH≤2). Ezután 50 µl mintaelegyhez 500 µl 1,32 M ammónium-rodanidot adagoltam, biztosítva az ammónium-rodanid felesleget. A reakció elegyet ezt követően 1 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel, majd rövid időn belül (maximum 5 perc) megmértem az abszorbanciát 460 nm-es hullámhosszon.

4.3.4 Extracelluláris elektron-közvetítő képzés vizsgálata

Az extracelluláris mediátor képzés vizsgálatához BIFFINGER és munkatársai (2011) által használt módszereket alkalmaztam módosításokkal. A megfelelő mennyiségű extracelluláris elektron közvetítő előállításához a mikroba kultúrát 48 órán keresztül inkubáltam 30 °C-on aerob, anaerob és mikrobiális üzemanyagcella rendszerben. A sejtek elválasztása érdekében az inkubációt követően a tápközeget 10 percig 15 °C-on centrifugálam 5500 g gyorsulási erővel, így a kisebb méretű extracelluláris fehérjék a felülúszó frakcióban maradtak. Ezt követően a felülúszót 0,2 µm-es pórusméretű poli-tetra-fluor-etilén (PTFE) szűrővel szűrtem, és meghatároztam a szűrletben az extracelluláris elektron közvetítő tulajdonságú anyagok mennyiségét (fehérje- és flavintartalom).

4.3.5 Mikrobák tapadásának vizsgálata

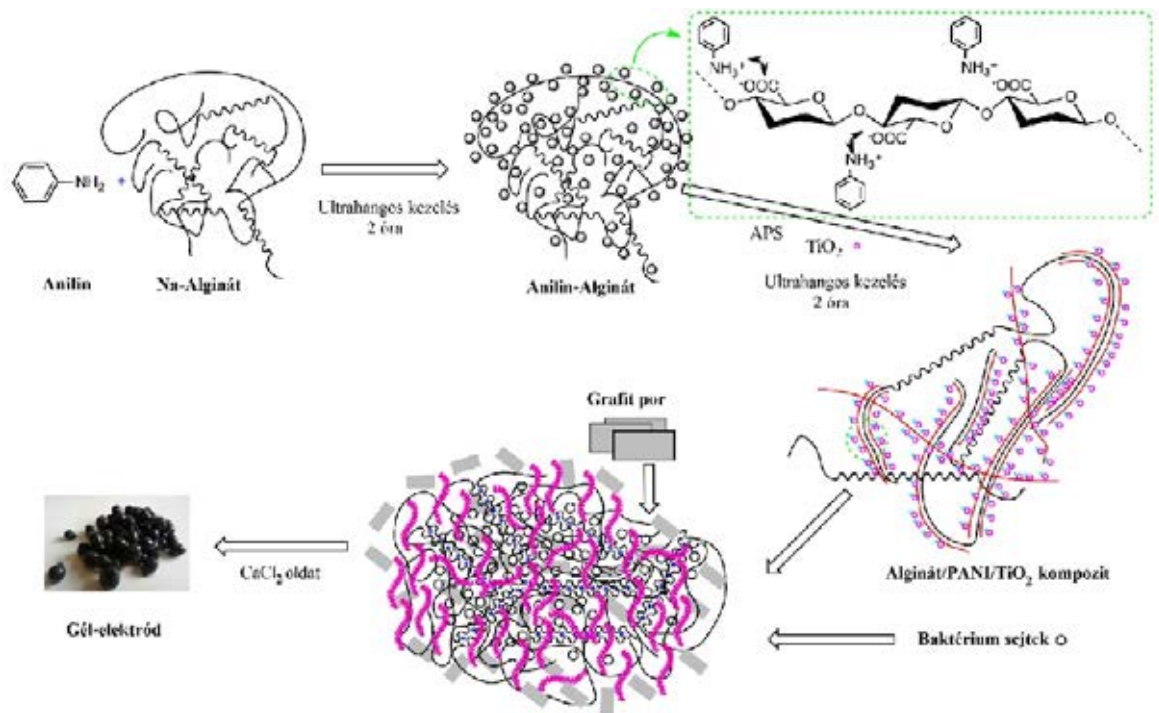
A mikrobák különböző felületekre való tapadásának vizsgálatára BEENKEN és munkatársai (2003) által publikált módszert alkalmaztam a körülményeknek megfelelő módosításokkal. Egy 96-lyukú microplate lemez minden zsebét megtöltöttem 190 µl tápközzel, majd 10 µl legalább 10^7 TKE/ml koncentrációjú 1 napos tenyésztéssel oltottam be. A lemezeket 48 órán keresztül inkubáltam 30°C-on rázatás nélkül. Az inkubálást követően eltávolítottam a tápközeget és 0,5 M-os Sörensen foszfát pufferrel (pH=7) többször (3-4-szer) mostam. A lemez aljára tapadt sejteket 200 µl 96%-os etanollal rögzítettem, majd átmostam 0,5 M-os Sörensen foszfát pufferrel. Ezt követően 2 percig 200 µl 0,41 m/V%-os etanolos kristály ibolya festék oldattal festettem, majd újra átmostam több alkalommal a 0,5 M-os Sörensen foszfát pufferrel. A következő lépésben 100 µl 96%-os etanollal felszuszpendáltam a rögzült sejteket a zseb aljáról, majd megmértem az abszorbanciáját 595 nm fényhullámhosszon. A megtapadt sejtek mennyiségének meghatározására kalibrációt végeztem. A méréseket 5 párhuzamosban hajtottam végre.

A különböző elektródok felületén megtapadt mikrobák számának meghatározására szintén BEENKEN és munkatársai (2003) által publikált módszert alkalmaztam kisebb módosításokkal. Az elektródok egységesen négyzet alakúak (25 mm x 25 mm) voltak. Először a vékony elektródokat elhelyeztem a mikrolemez zsebében, majd hozzáadtam 4,5 ml tápközeget és autoklávban sterilizáltam. Ezt követően zsebenként 500 µl 10^7 sejt/ml sejtenyésztéssel oltottam be és a 48 órás inkubálás után eltávolítottam a tápközeget. Az elektródokat 0,5 M-os Sörensen foszfát pufferrel (pH=7) többször (3-4-szer) átmostam. A sejtek fixálására, a zsebekre 1-1 ml 96%-os etanol adtam, majd 2 perc elteltével újra átmostam 0,5 M-os Sörensen foszfát pufferrel (pH=7). A megtapadt sejteket 2 percig 1 ml 0,41 m/V%-os alkoholos kristály ibolya festék oldattal festettem, majd a

felesleges festéket lemostam a puffer oldattal. Ezután 1 ml 96%-os etanollal leoldottam a rögzült sejteket és 595 nm-en mértem a szuszpenzió abszorbanciáját. A megtapadt sejtek mennyiségének meghatározására kalibrációt készítettem. A mérések során 3 ismétlést végeztem elektródajtánként.

4.3.6 Vezetőképes gél-anód létrehozása

A gél-anódokat elektromosságot vezető hidrogélből hoztam létre BASAVARAJA és munkatársai (2010a) kísérletei nyomán. A gél elkészítéséhez 0,1 g Na-alginátot oldottam fel 10 ml desztillált vízben, majd intenzív keverés mellett hozzáadtam a megfelelő mennyiségű anilint (0-0,02 g/ml koncentrációban). Az anilin-alginát gélhálózatot 2 órás ultrahangos kezeléssel alakítottam ki (37 kHz) (14. ábra).



14. ábra: A gél-elektrod kialakítás lépései (BASAVARAJA *et al.*, 2010b nyomán)

A nano-kompozit szerkezet kialakításához különböző koncentrációban titán-dioxidot (0 - 100 mg/ml) és 0,01 g/ml ammónium-perszulfátot használtam, majd ismét ultrahangos kezelést hajtottam végre 2 órán keresztül -10°C-on (LOKESH *et al.*, 2008). A nanokompozit végső kialakításakor különböző koncentrációban grafit port (0-0,05 g/ml) adtam az elegyhez, valamint 10⁷ TKE/ml mennyiségű elektrogén baktérium kultúrát (*Shewanella algae*), majd az elegyet 10 mM-os kalcium-klorid oldatba csepegtettem. A folyamat eredményeképpen, 0,5 – 0,8 cm átmérőjű kompozit hidrogélhez jutottam (14. ábra).

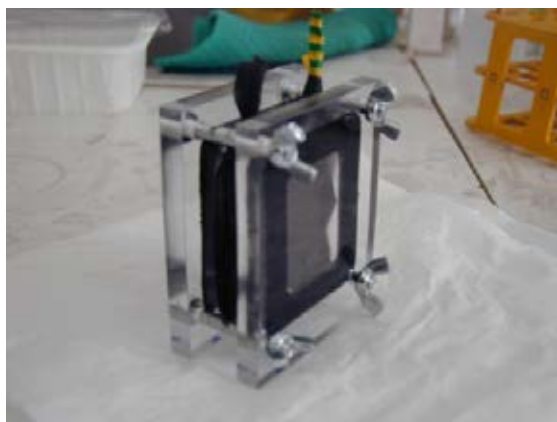
4.3.7 Nikkel bevonatú katód létrehozása

Rézhálóra galvanizálás segítségével nikkel bevonatot készítettem. A bevonni kívánt hálót 90°C-os 0,6 M-os Na_3PO_4 és 1 M-os $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ oldattal zsírtalanítottam, majd desztillált vízben mostam. Ezután az elektródot galván fürdőbe (0,5 M-os NiCl_2 oldat) merítettem és alacsony feszültséggel (2 V) és áramsűrűséggel (10 mA/cm^2) galvanizáltam. A katód felülete 124 cm^2 volt. A galvanizáláshoz használt nikkel elektród legalább 95%-ban tartalmazott fém nikkelt (Alfa Aesar, USA).

4.4 Mikrobiális üzemanyagcella összeállításai

4.4.1 Két-kamrás mikrobiális üzemanyagcella

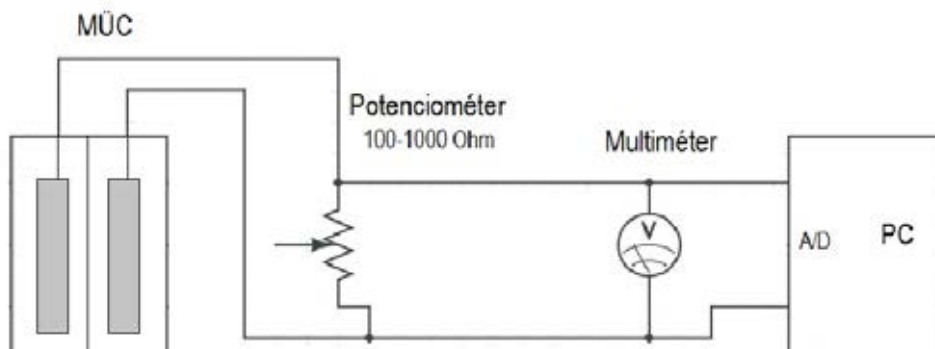
Kutatásomban „szendvics”-forma típusú kétkamrás mikrobiális üzemanyagcellát alkalmaztam, amely külön-külön anód- és katódtérrel rendelkezik, a két teret Nafion 117 proton-szelektív membrán választotta el egymástól (15. ábra). A cella össztérfogata 24 cm^3 . A mérési beállításnak megfelelően különböző anyagokat (grafit szálakból szőtt grafit lap, acéllemez vagy alumínium lemez stb.) használtam elektródként.



15. ábra: A kétkamrás MÜC felépítése

Az anódtérbe tápközeget és mikrobákat juttattam 10^6 - 10^7 TKE/ml beoltási sejt mennyiségben, vagy gélbe zárt mikrobákkal (elektród fejlesztési vizsgálatok esetén). A katódtérben oxidálószerként 0,1 M-os kálium-hexaferrocianát oldatot használtam 0,5 M-os Sörensen foszfát pufferben (pH=7) oldva. A beoltást követően az üzemanyagcellát a mérőműszerre kötöttem, amely számítógéphez csatlakozott (16. ábra). Adatok gyűjtéséhez és tárolásához Labview (National Instruments, USA) programcsomagot használtam. Az üzemanyagcellában keletkező elektromos feszültséget multiméterrel (Voltcraft-820) mértem. A mérés során a mikrobiális üzemanyagcellához 100 - $1000 \ \Omega$ változtatható ellenállást

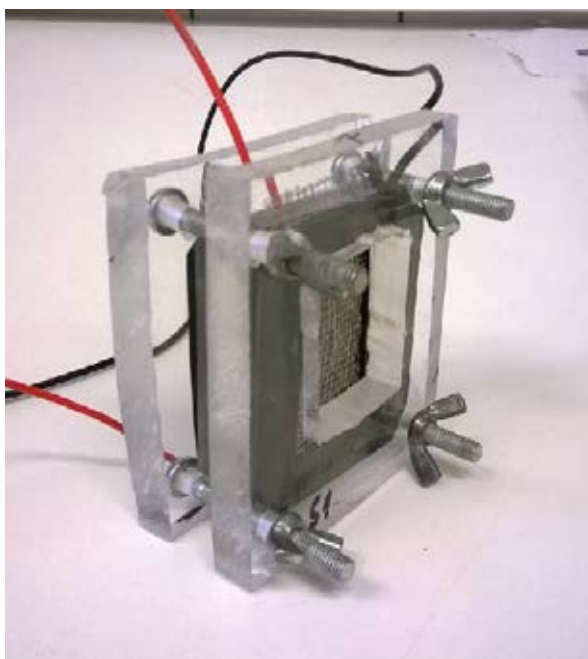
(potenciométer) kötöttem, így a kapott feszültség értékekből Ohm-törvénye alapján számolhattam az áramerősséget.



16. ábra: A mikrobiális üzemanyagcella rendszer felépítése

4.4.2 Egykamrás szakaszos üzemű üzemanyagcella

A mikrobiális üzemanyagcella légkatód fejlesztési kísérleteihez egykamrás szakaszos üzemű, mediátor nélküli mikrobiális üzemanyagcellát alkalmaztam (17. ábra).



17. ábra: Az egykamrás MÜC felépítése

Ez az üzemanyagcella összeállítása szerint megegyezik a kétkamrással, azzal a különbséggel, hogy nem tartalmaz katód teret, így a katódot közvetlenül a proton szelektív

membránhoz illesztettem. Az anódtérben a szőtt grafit elektródot használtam, amelynek hasznos felülete 12 cm².

4.5 Analitikai módszerek

4.5.1 Riboflavin tartalom meghatározása

A felülúszó riboflavin tartalmának meghatározására fotometriás módszert alkalmaztam (European Pharmacopoeia 01/2008:0292). Barna üvegből készült, 100 ml-es mérőlombikban 10 ml mintához 5 ml 0,1 M-os nátrium-hidroxid oldatot adtam, majd 2,5 ml tömény ecetsavat. Az elegyet desztillált vízzel 100 ml-re hígítottam. Ezt követően kivettem 1 ml mintát és hozzáadtam 1 ml 14 g/l koncentrációjú nátrium-acetát oldatot, majd kiegészítettem 10 ml-re desztillált vízzel. Rövid idejű pihentetés után 444 nm-en megmértem az oldat abszorbanciáját. A mennyiségi meghatározáshoz ismert koncentrációjú riboflavin oldatok segítségével készítettem kalibrációs görbét. A méréseket minden esetben 3 párhuzamossal végeztem.

4.5.2 Fehérjetartalom mérése

A minták fehérjetartalmának a mérését megelőzően egy koncentráló lépést is végrehajtottam. A mintákhoz 50%-os arányban -18°C-os izo-propanolt (REANAL, Budapest) adtam. A kicsapott fehérjéket centrifugálással (10000 rpm, 15 perc, 4°C) összegyűjtöttem és 2 ml 0,5 M-os Na-acetát pufferben szuszpendáltam. Ezt követően módosított Bradford módszerrel (BRADFORD, 1976) határoztam meg a fehérjetartalmat.

Az eljárás alapelve, hogy a fehérjék egy kromofór reagenssel (Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad, USA) színes komplexet hoznak létre, amely fotometriásan mérhető. A módszer mérési tartománya 1 és 140 µg/ml között van. A méréseket minden esetben 3 párhuzamossal végeztem.

4.5.3 Fehérjék vezetőképességének meghatározása

A mintákban lévő fehérjék vezetőképességének méréséhez egy két-elektrodos ellenállásmérő cellát hoztam létre. Az ellenállás meghatározásához a cella elektródjai közé 1 ml fehérje oldatot injektáltam és elektromos áramot vezettem rajta keresztül. Ohm törvénye alapján számoltam az ellenállást, majd az ellenállás reciproka adta a fehérje oldat vezetőképességét. Az eredményeket a 0,5 M-os Na-acetát puffer vezetőképességével korrigáltam. A méréseket minden esetben 3 párhuzamossal végeztem.

4.5.4 Elektromos paraméterek meghatározása

A mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramtermelését különböző mérőszámokkal jellemeztem, amelyek lehetnek a feszültség (U), az üresjárású feszültség (U_{oc}) az áramerősség (I), az elektromos vezetőképesség (G), az elektromos kapacitás (Q), az elektromos teljesítmény (P), a fajlagos áramerősség és a fajlagos teljesítmény (p). A feszültség és üresjárású feszültség értékeket közvetlenül mértem. A feszültség esetén elektromos ellenállást (R_{ext}) beiktatva az áramkörbe, míg üresjárású feszültség esetén ellenállás nélkül történt a mérés. A további mérőszámok a következő képletekkel kifejezhetők:

Vezetőképesség:

$$G = \frac{1}{R}, [S]$$

Áramerősség:

$$I = \frac{U}{R_{ext.}}, [A]$$

Az üzemanyagcella kapacitása:

$$Q = \int I \cdot dt, [Ah]$$

MŰC teljesítménye:

$$P = U \cdot I = I^2 \cdot R = U^2/R, [W]$$

Elektród felületre vonatkoztatott teljesítmény:

$$\rho = \frac{P}{A}, [W/m^2]$$

Anód térfogatra vonatkoztatott fajlagos teljesítmény:

$$p = \frac{P}{V}, [W/m^3]$$

4.6 Statisztikai vizsgálatok

A mért eredmények statisztikai értékeléséhez Microsoft Excel, Statistica 8 (Statsoft) és R-project (Lucent Technologies, USA) szoftvereket használtam.

A vas(III)-redukciós tesztben mért abszorbancia változások és a mikrobiális üzemanyagcellában mért elektromos paraméterek (fajlagos elektromos áram és kapacitás) közti kapcsolatot lineáris korrelációval jellemeztem. A lineáris korreláció erősségét a Pearson-féle korrelációs együtthatóval (r) mértem.

Az üzemanyagcella elektromos mérőszámai és a vas-redukciós tesztben kapott eredmények összefüggéseinek vizsgálatára lineáris regressziós módszert alkalmaztam. Az illesztett modellek jellemzését a regressziós statisztikával (koefficiensek, t-próba), determinációs együtthatóval (R^2), az átlagos négyzetes hiba gyökével (RMSE) és Durbin-Watson autokorrelációs teszttel végeztem.

A többszörös lineáris regresszió során a függő változót egyszerre több független változóval is összefüggésbe hozzuk. Ezt a statisztikai módszert alkalmaztam, amikor a mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramtermelését jellemeztem a vas(III)-redukciós teszt eredményeivel és a beoltási sejtszámokkal. Az illeszkedést ebben az esetben is regressziós statisztikával, determinációs együtthatóval (R^2), az átlagos négyzetes hiba gyökével (RMSE) és Durbin-Watson autokorreláció teszttel vizsgáltam.

A determinációs együttható megmutatja, hogy a függő változó variabilitásából a függő változó mekkora részben magyaráz. Ha egy közeli az értéke ($R^2=1$) akkor teljes mértékben leírható, míg ha $R^2=0$, akkor véletlenszerű a kapcsolat a két változó közt (REICZIGEL *et al.*, 2010).

A becslések hibájának megadásának egy gyakran alkalmazott mutatója az átlagos négyzetes eltérés (MSE) és gyöke (RMSE), a modellek jóslott és valódi értékei közti különbség kimutatására. Az RMSE a reziduumok négyzetének átlagából von gyököt, ezáltal egy jellemző eltérést kapunk a mért és becsült adatok között. Minél kisebb az RMSE értéke annál jobban illeszkedik a modell a minta pontjaira. A módszer előnye, hogy könnyen magyarázható, mivel mértékegysége azonos a mért adatokéval (BARANYAI, 2012; REICZIGEL *et al.*, 2010).

A megfelelő modell feltétele, hogy az egyes megfigyelésekhez tartozó reziduumok egymással korrelálatlanok legyenek, azaz az egyik változóérték melletti kis vagy nagy értékeik ne jelentsenek semmiféle információt egy másik megfigyelés érték esetére, tehát egymástól függetlenek legyenek. Az elsőrendű autokorrelációs együtthatót a regressziós reziduumokból becsülhető, a Durbin-Watson próba statisztika segítségével (VARGA és SZILÁGYI, 2011).

A szubsztrátum hasznosítás és vas-redukciós vizsgálatok során a különböző szubsztrátumok hatására kialakult változások különbségeinek megerősítésére kétmintás t-próbát alkalmaztam. A

két csoportot összehasonlító paraméteres próbák (t-próbák) az átlagos változást vizsgálják. A nullhipotézis az, hogy a két vizsgált sokaság átlaga azonos. A próbát 95%-os szignifikancia szint mellett vizsgáltam, kétoldali kritikus tartománnyal.

A modell alkotás során elemeztem az egyes (kiugró) pontok torzító hatását a létrehozott modellre. Az egyes modell pontok torzító hatását Cook-féle távolsággal, valamint az adott pont elhagyása következtében történő determinációs koefficiens változásával vizsgáltam. A módszerek végrehajtásához R-project szoftvert alkalmaztam (REICZIGEL *et al.*, 2010).

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1 Mikrobák alkalmazhatósági vizsgálata mikrobiális üzemanyagcella biokatalizátoraként

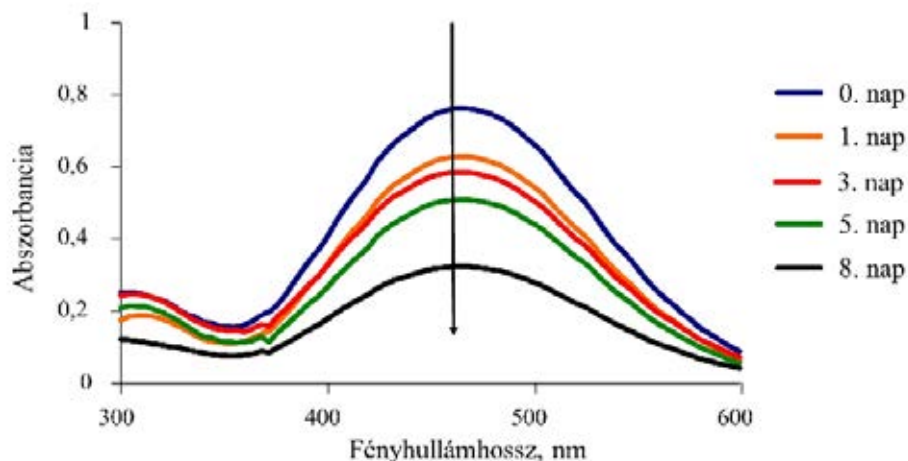
6.1.1 Gyors szelektálási módszer a mikrobiális Fe³⁺-redukció alapján

6.1.1.1 Módszer fejlesztés

Minden mikroorganizmus anyagcsere-folyamatai során termel elektronokat, de nem minden mikroba képes ezen elektronokat a sejten kívüli térbe transzportálni. A mikrobák MÜC-ben való alkalmazhatóságának megállapításában fontos tényező az elektronátadási képesség, amely jelenleg paradox módon csak a MÜC aparátusának alkalmazásával mutatható ki megbízhatóan. E módszernek a legnagyobb hátránya, hogy idő- és műszerigényes, hiszen minden egyes törzs vizsgálatához legalább egy MÜC-re lenne szükség, amely így rendkívül költséges. Tekintettel a mikroorganizmusok nagy diverzitására, az ez irányú kutatás fontos lehet a sikeres MÜC-rendszerek kialakításában.

Munkámban Fe³⁺-redukción alapuló gyors módszert dolgoztam ki. A módszer alapelve, hogy a mikrobák anaerob körülmények között az anyagcseréjük során képzett redukált koenzimek regenerálódása során képződő elektronokat a sejtfallal külsőmembrán elektronláncán keresztül a vas(III)-ionoknak adják át. Ez az elektrontranszportlánc megegyezik a MÜC anódterében lejátszódó folyamattal (FENG *et al.*, 2013). A mikrobák tenyésztése során a tápközeget vas(III)-citrát oldattal egészítettem ki és 24 óránként mintát vettem. A minták vas(III)-tartalmát ammónium-rodanid oldattal határoztam meg savanyított közegben (pH~2) fotometriásan.

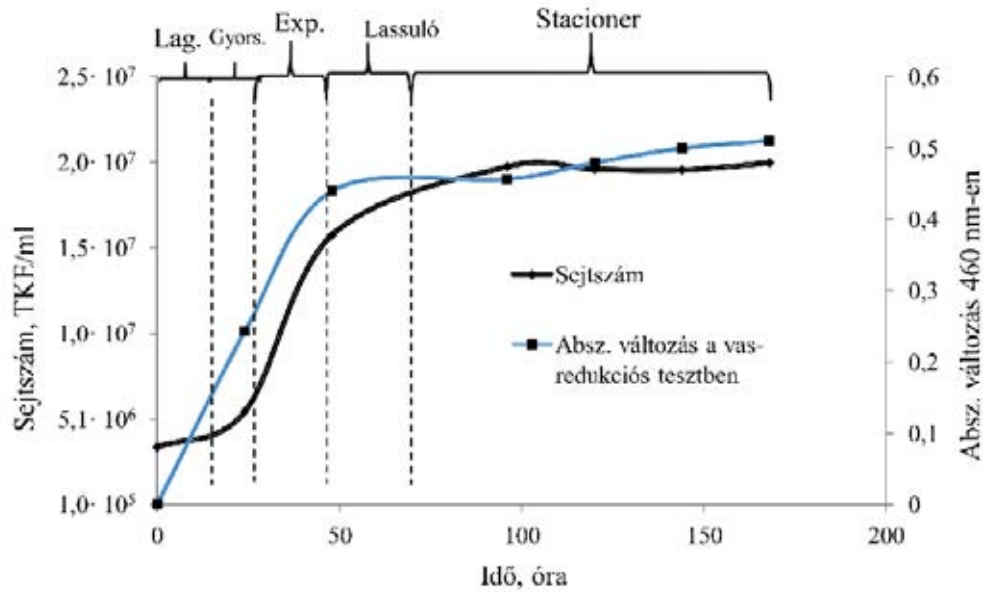
A mérési módszer fényhullámhosszának meghatározása során *Geobacter toluenoxidans* DSMZ 19350 törzset alkalmaztam a redukációs tesztben. A kezelt minták abszorbanciáját 300 nm és 600 nm közötti tartományban mértem 5 nm-es léptékkal. A kapott eredményeket a 18. ábra szemlélteti. Látható, hogy a 300 nm hullámhosszról indulva 360 nm hullámhosszig stagnált az abszorbancia érték. Azt követően gyorsan növekedett és 440-480 nm-en érte el a maximumot, majd jelentősen csökkent. Az abszorbancia értékek szimmetrikus Gauss görbét követnek. Ez azt jelenti, hogy egyre kevesebb Fe³⁺-ion található a tápközegben, azaz egyre több ion redukálódott el. A reakció végbemeneteléhez szükséges elektron mennyiséget az alkalmazott mikroorganizmus biztosítja, így az összefüggés felírható az extracelluláris elektrontermelőképeség és a 440-480 nm-es tartományban mért abszorbancia, avagy a Fe³⁺ redukáló képessége között. Mivel a 440-480 nm hullámhossztartományban nem tapasztaltam jelentős eltéréseket, így a méréseimhez a 460 nm-es hullámhosszt választottam.



18. ábra: *Geobacter toluenoxydans* Fe³⁺-redukciós vizsgálatának abszorbancia spektruma különböző mintavételi időpontokban

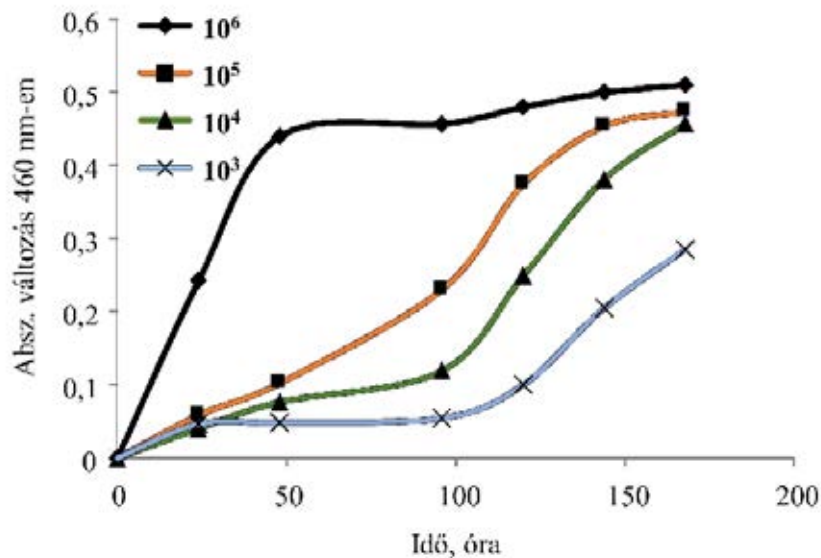
A mikrobák szaporodási és Fe³⁺-redukciós képességének összehasonlítására *Saccharomyces cerevisiae* törzset használtam metilén-kékkel, mint redox-mediátorral kiegészítve. A vizsgálathoz YEPD táplevest alkalmaztam kiegészítve vas(III)-citráttal 5 g/l-es koncentrációban. A beoltási dózis 10⁶ TKE/ml sejtkoncentráció volt. A kapott szaporodási és vas(III)-redukciós görbéket a 19. ábra szemlélteti. A szaporodási görbén megfigyelhetők a jellemző szakaszok: lag, gyorsuló, exponenciális, lassuló és stacioner fázis módosulásokkal. Anaerob körülmények között a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőnek körülbelül 5-10 órára van szüksége, hogy a lag-fázisból az exponenciálisba lépjen. A módosított tápközeg esetén azonban az élesztő anyagcseréje is változott, mely következtében a lag fázis 15-20 h órára nyúlt. Az exponenciális szakasz megközelítőleg 24 órán keresztül tartott.

Az élesztő Fe³⁺-redukáló képessége már 10⁶ sejt/ml beoltást követően is detektálható volt (19. ábra) és folyamatosan növekedett a stacioner fázisig. Ennek értelmében kapcsolatot feltételezek a vas(III)-redukció és az élő sejtek száma között. Erre a jelenségre magyarázattal szolgálhat, hogy a leadott extracelluláris elektronok az elsődleges anyagcsere során keletkeznek, ami szorosan kapcsolódik a mikroba szaporodási képességéhez. Ez eredményeim hasonlóak KASHEFI és munkatársai (2008) által közölt megfigyelésekkel.



19. ábra: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságai

A különböző kezdeti sejt koncentrációk vas-redukcióra gyakorolt hatásának vizsgálatához vas(III)-citráttal kiegészített tápközegeket 10^3 , 10^4 , 10^5 és 10^6 TKE/ml élesztő sejtmenyiségekkel oltottam be. A vas-redukció időbeni változását a 20. ábra szemlélteti.



20. ábra: A beoltási sejtmenyiség hatása a *Saccharomyces cerevisiae* Fe^{3+} -redukciójára

Azt tapasztaltam, hogy a 10^6 sejt/ml sejt koncentrációval végzett inokuláció nagyobb mértékben okozott a tápközegben vas(III)-ion tartalom csökkenést. Ebben az esetben 50 órás tenyésztés után a 460 nm-en mért abszorbancia változás elérte a 0,5 körüli értéket majd ezt követően az értékek stagnáltak. Ennél kisebb sejt koncentrációval (10^5 sejt/ml vagy kisebb) történő

beoltás esetén határozottan tapasztalható „lag-szakasz” kialakulása a Fe^{3+} -redukciós görbén is, ezekben az esetekben csak kismértékben detektálható a vas-redukció intenzitásának növekedése. A 10^3 - 10^4 TKE/ml beoltásnál akár 100 órára is szükség van az egyértelmű vas-redukciós képesség kimutatásához. Az eredmények alapján megállapítottam, hogy a beoltási sejtkoncentráció jelentősen befolyásolja mikroba Fe^{3+} -redukcióját.

A vas(III)-rodanid komplex abszorbanciája nagymértékben függ a reakció körülményeitől, mint a hőmérséklet, pH, mérési idő hossza és az idegen ionok jelenléte (TARAFDER és THAKUR, 2005). Ezen faktorok közül a hőmérséklet, a pH és a mérési idő egyszerűen szabályozhatóak. Néhány kation (titán, vanádium, nobélium, tantál, cirkónium, króm, molibdén, cézium és volfrám) befolyásolhatja a vas-rodanid-komplex kialakulását, azonban általában a tenyésztési tápközegekben ezeknek a kationoknak a koncentrációja csekély, így nincs hatásuk a mérések kimenetelére. A kutatók azt tapasztalták, hogy 10 mg/l idegen ion koncentráció kb. 2%-os hibát okozhat 1 mg/l vas(III) kimutatásánál, így ez a hibatenyező is elhanyagolható (HAYASHI *et al.*, 1986; TARAFDER és THAKUR, 2005).

6.1.1.2 Néhány mikroorganizmus vas(III)-redukciós tulajdonsága

A kutatásomban megvizsgáltam különböző mikroorganizmusok vas(III)-redukciós képességét az általam kidolgozott Fe^{3+} -redukción alapuló gyors szelektáló módszerrel metilén-kék mediátor jelenlétében és hiányában. A MŰC szempontjából olyan mikroba fajok relevánsak, melyek közvetlenül képesek az elektronjaikat sejten kívülre transzportálni és átadni az elektródnak. Ebből a szempontból előnyös olyan kultúrákat felhasználni, amelyek nem igénylik mediátor(ok) alkalmazását. A vizsgálatokhoz különböző potenciálisan vas-redukáló és nem-vasredukáló mikrobákat használtam fel. Mediátor (metilén-kék) jelenlétében csak azokat a mikrobákat vizsgáltam, amelyek feltételezhetően mediátor nélkül nem képesek az extracelluláris elektron transzferére. Ez alól kivételt képez a *Shewanella algae*, melyről feltételeztem ezt a képességet. A módszer fejlesztésében *S. algae*-t alkalmaztam pozitív kontrollként. A mérés eredményeit a 4. táblázat szemlélteti.

4. táblázat: Vas(III)-redukciós képesség vizsgálata különböző mikrobák esetében (SZÖLLŐSI *et al.*, 2015b)

Mikrobák	Vas(III)-redukció*
Mediátor jelenlétében	
<i>Shewanella algae</i>	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+++
<i>Escherichia coli</i>	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++
Mediátor nélkül	
<i>Shewanella algae</i>	+++
<i>Shewanella woodyi</i>	+++
<i>Shewanella xiamenensis</i>	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++
<i>Escherichia coli</i>	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	+++
<i>Geobacter toluenoxidans</i>	+++
<i>Geobacter metallireducens</i>	+++

*Vas(III)-redukció: (-) nem volt detektálható abszorbanca változás, (+) az abszorbanca változás 0,1 alatt maradt, (++) az abszorbanca változás 0,1-0,2 közötti, (+++) az abszorbanca változás több mint 0,2 volt 48 órás inkubáció során. Metilén-kéket alkalmaztam mediátorként.

Megállapítottam, hogy a *Lactobacillus plantarum* kivételével minden vizsgált mikroorganizmus jelentős Fe^{3+} -redukciót mutatott még metilén-kék redox-mediátor hiányában is, ami feltételezi a mikrobák extracelluláris elektron termelését és a tápközegbe történő szekrécióját. *Geobacter* és *Shewanella* fajokat vas-redukáló baktériumként tartják számon (WEBER *et al.*, 2006). Ebben a tekintetben a *S. algea*, *S. woodyi* és *S. xiamenensis*, valamint *G. metallireducens*, *G. sulfurreducens* és *G. toluenoxidans* esetében mért eredmények megerősítik a mikroorganizmusok extracelluláris elektrontermelő (elektrogén) képességét.

Lactobacillus plantarum faj esetén csak metilén-kék jelenlétében mutattam ki a Fe^{3+} -ionok redukcióját, amely azt jelenti, hogy e faj nem képes közvetlenül, hanem csak mediátoron keresztül átadni elektronjait a sejten kívüli akceptornak.

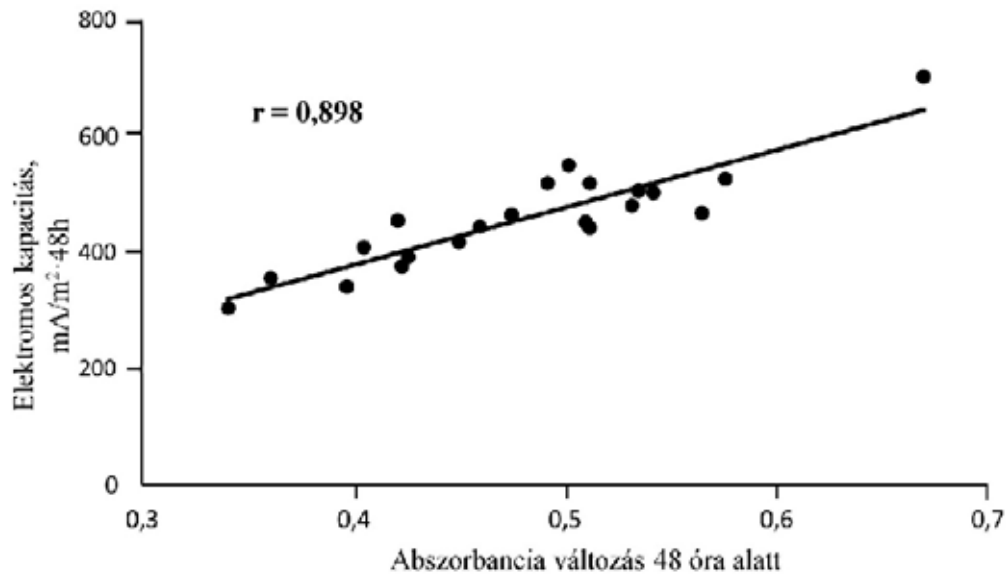
Az *E. coli* faj esetében nem várt eredmények születtek. A vas(III)-redukció rendkívül intenzív volt mind metilén-kék jelenlétében, mind annak hiányában. Némely tanulmány beszámol *E. coli* törzsek MÜC-ben való alkalmazásáról, azonban ezekben a rendszerekben rendszerint redox-mediátorok (pl. metilén-kék, metil-narancs) használatával érik el a hatékony elektron transzportot (PARK és ZEIKUS, 2000; ZOU *et al.*, 2007). HERRERRO-HERNADEZ és munkatársai (2013) sikeresen létrehoztak és üzemeltettek mediátor nélküli MÜC-öt *E. coli* törzsszel (INVaF) szennyvíz szubsztrátumon. Így feltételezhető, hogy némely *E. coli* törzs képes a metabolizmusa

során képződött elektronjait közvetlenül az üzemanyagcella elektródjára juttatni. A méréseimben alkalmazott *E. coli* ATCC 8739 törzs feltételezhetően ezen elektrogének csoportjába tartozik.

Saccharomyces cerevisiae élesztő esetében intenzívebb Fe^{3+} -redukciót detektáltam redox-mediátor jelenlétében, mint nélküle. Számos tanulmány megemlíti, hogy élesztő fajokkal is képesek voltak elektromos áramot létrehozni mediátor nélküli MÜC-rendszerekben (PRASAD *et al.*, 2007; RAGHAVULU *et al.*, 2011). Egyes feltételezések szerint élesztő-alapú MÜC esetén az elektromos áramtermelésben csak az anóddal közvetlenül érintkező mikrobák vesznek részt, emiatt az elérhető teljesítmény viszonylag alacsony. Továbbá, a redox körülmények és a szubsztrátum koncentráció (Pasteur- és Crabtree-effektus)(JAFARY *et al.*, 2013) jelentősen befolyásolják az élesztők anyagcseréjét, így az extracelluláris elektron termelést is. Mediátorok (metilén-kék vagy metil-narancs) hozzáadásával szignifikánsan megnövelhető az élesztőt használó mikrobiális üzemanyagcellák elektromos áramtermelése (RAHIMNEJAD *et al.*, 2011; 2012b). Ennek az az oka, hogy a mediátorok hatékonyan szállítják a megtermelt elektronokat (olyan sejtekből is, amelyek nem tapadnak meg közvetlenül az elektródhoz) (BABANOVA *et al.*, 2011). A vas-redukciós tesztben a vas(III)-ionok oldott állapotban vannak jelen, így az intenzív elektrontranszfer feltételezhető. Emellett azt tapasztaltam, hogy a metilén-kék hozzáadásával még tovább növelhető az elektrontraszport intenzitása.

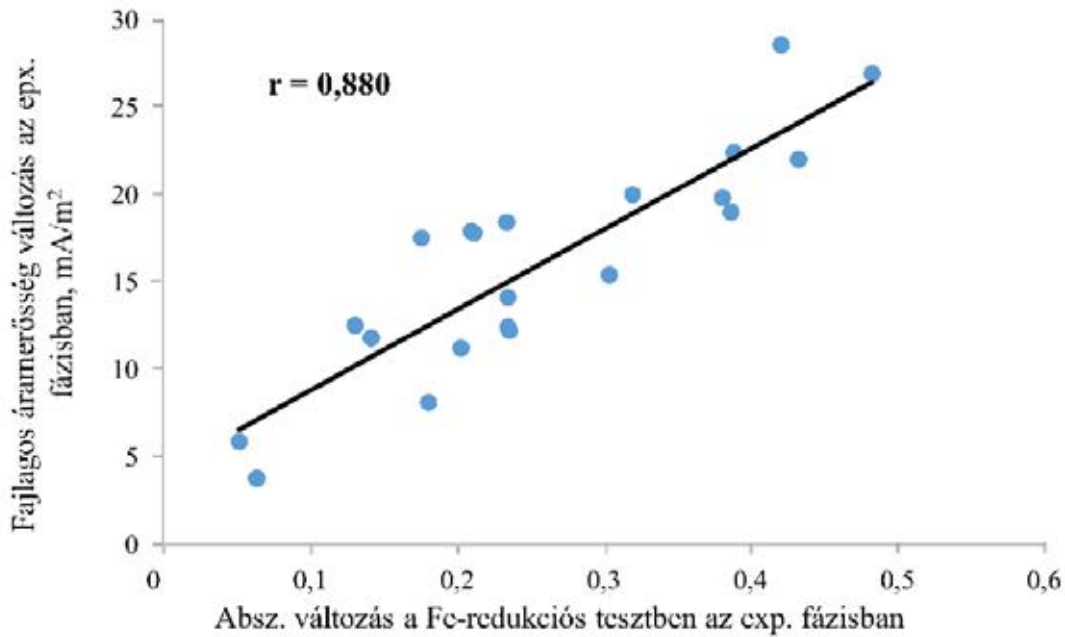
6.1.1.3 Az áramerősség és az elektromos kapacitás kapcsolata a mikrobás vas(III)-redukcióval

Az egyes mikroorganizmusok vas(III)-redukciós képességének és a mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramtermelése összefüggésének feltárására kétkamrás MÜC rendszert alkalmaztam. A mérés során mértem a képződött feszültséget, amiből fajlagos áramerősséget számoltam. A MÜC elektromos kapacitását a 48 óra alatt mért összes megtermelt elektromos áramból számítottam. A mérésekhez *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt metilén-kék mediátorral és mediátor nélkül, *Shewanella algae*, *S. japonica*, *S. woodyi*, valamint *Geobacter toluoxydans*, *G. sulfurreducens* és *G. metallireducens* baktérium kultúrákat használtam fel. A redukciós tesztben mért abszorbancia változást és MÜC kapacitásokat a 21. ábra szemlélteti.



21. ábra: A MÜC-ben képződött elektromos kapacitás és a 48 óra alatt lezajló vas(III)-redukció összefüggése

A kapott adatok alapján korreláció vizsgálatot végeztem Pearson-féle korrelációs vizsgálattal, ami lineáris kapcsolatot feltételez ($r=0,898$, $n=20$, $\alpha=0,05$) a cellák elektromos kapacitása és az abszorbancia változás eredményei között. Ennek értelmében a mikrobiális üzemanyagcella kapacitása becsülhető a vas(III)-redukciós teszt során mért abszorbancia változása alapján. Eredményeim megerősítik FENG és munkatársai (2013) megállapításait, miszerint lineáris kapcsolat feltételezhető a termelt elektromos áram és a mikrobiális Fe^{2+} képzés között.



22. ábra: A MÜC-ben képződött fajlagos elektromos áram és a vas(III)-redukció kapcsolata

Az abszorbancia változás eredményei és a maximális fajlagos elektromos áramtermelés között nem lehet egyértelmű kapcsolatot megállapítani, viszont, ha mind a vas-redukciós teszt, mind az üzemanyagcella mérési adatait leszűkítjük a szaporodás (és vas-redukció) exponenciális szakaszára, akkor ebben az esetben is lineáris kapcsolat ($r=0,880$, $n=20$, $\alpha=0,05$) fedezhető fel (22. ábra). Ez a kapcsolat azzal magyarázható, hogy a mikroorganizmusok által megtermelt és átadott elektronok hozzák létre a vas(III)-ionok mennyiségének változását, ugyanúgy, mint a MÜC-ben képződő elektromos áramot.

A vas(III)-redukciós tesztben kapott eredmények alapján joggal feltételezhető a kapcsolat a beoltási sejtszám, a mért abszorbancia változás és a MÜC-ben termelt elektromos áramerősség között. A fajlagos elektromos áramtermelést és az abszorbancia változást a fermentáció azonos időszakában (exponenciális szaporodási szakasz) mértem. A modell létrehozásához kétváltozós (a 460 nm-en mért abszorbancia változás és a beoltási sejtszám logaritmus) lineáris regressziós módszert alkalmaztam. A függőváltozó ebben az esetben a fajlagos elektromos áramerősség volt.

A regresszió analízis eredményei alapján a következő egyenlettel (Model 1) írható le a mikrobiális üzemanyagcella fajlagos áramtermelése az abszorbancia változás és a beoltási sejtszám logaritmusának függvényében:

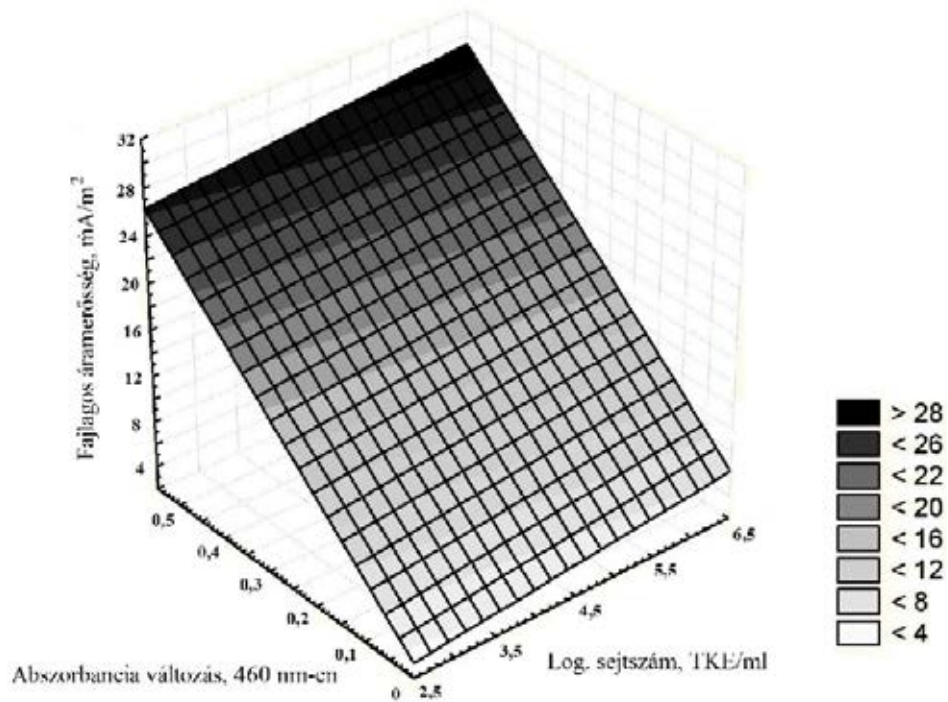
Modell 1: $z = 41,771 \cdot x + 0,726 \cdot y + 1,513$

ahol,

z: fajlagos elektromos áramerősség (mA/m^2),

x: 460 nm-en mért abszorbanca változása,

y: beoltási sejtszám logaritmus (TKE/ml).



23. ábra: A fajlagos elektromos áramtermelés modellje a vas(III)-redukció és a beoltási sejtkoncentráció függvényében

Az eredmények háromdimenziós ábrázolását a 23. ábra szemlélteti. Regressziós statisztikát végezve a t-próba szerint, mind az abszorbanca változás ($p=0,000035$, $t=5,458$, $t_{\text{krit}}=1,725$), mind a beoltási sejtszám ($p=0,41074$, $t=1,842$, $t_{\text{krit}}=1,725$) szignifikánsan befolyásolta a függő változót, így nem hagyhatók el a modellből.

A modell pontokra való illeszkedését a determinációs koefficiense (R^2) és az átlagos négyzetes hiba gyöke (RMSE) értékekkel jellemeztem. A R^2 értéke 0,77 az RMSE pedig $0,98 \text{ mA}/\text{m}^2$ voltak, így a modell megfelelő illeszkedését feltételeztem a biológiai rendszerek jellege miatt. Az autokorreláció ellenőrzésére végzett Durbin-Watson statisztika eredménye $d=2,2$ lett, ami a 1,54 és 2,59 kritikus értékek közötti ($n=20$, $\alpha=0,05$) volt, így megállapítható, hogy a modell hibái egymástól függetlenek.

Az eredmények alapján megállapítottam, hogy ha a kezdeti sejtszám nagyobb, mint 10^6 TKE/ml, akkor szorosabb összefüggés tapasztalható a fajlagos elektromos áramtermelés és a

mikrobás Fe^{3+} -redukció között. Ebben az esetben a modellből elhagyható a kezdeti sejtszám. A korrigált modell az alábbi egyenlettel (Modell 2) leírható.

Modell 2: $z = 46,04 x + 4,17$

ahol,

z: fajlagos elektromos áramerősség (mA/m^2),

x: 460 nm-en mért abszorbancia változása.

A modell determinációs koefficiense (R^2) 0,834 értéket ért el, míg az RMSE értéke 0,91 mA/m^2 volt, ami a háromdimenziós modellhez képest jobb illeszkedést feltételez. A modell autokorreláció vizsgálata $d=2,3$ értéket eredményezett, ami a 1,41 és 2,59 kritikus értékek közötti ($n=20$, $\alpha=0,05$) volt, így feltételezhető a megfelelő modell választás.

A mikrobiális üzemanyagcellában összes megtermelhető áram (elektromos kapacitás) modellezhető a vas(III)-redukáló képesség teljes abszorbancia változás értékeivel. Mivel itt a teljes anyagcsere folyamat lezajlik így a modell független az időtől és ezáltal a beoltási sejtkoncentrációtól is. Az eredmények alapján a regressziós modell a következő:

Modell 3: $z = 988,93 x - 17,58$

ahol,

z: elektromos kapacitás ($\text{mA}/\text{m}^2 \cdot 48\text{h}$)

x: 460 nm-en mért abszorbancia változása

A modell determinációs koefficiense (R^2) 0,808 értéket ért el, míg az RMSE értéke 8,21 $\text{mA}/\text{m}^2 \cdot 48\text{h}$ volt. Megállapítottam, hogy a modell illeszkedése megfelelő volt. A Durbin-Watson autokorrelációs statisztika $d=1,8$ értéket mutatott, ami 1,41 és 2,59 közötti ($n=20$, $\alpha=0,05$) volt, így nem állapítható meg függvénykapcsolat a hibatagok közt.

A modellek validálásához különböző *Geobacter* (*G. sulfurreducens*, *G. toluenoxydans*, *G. metallireducens*) és *Shewanella* (*S. algae*, *S. japonica*, *S. woody*) fajokat alkalmaztam. A vas(III)-redukciós tesztben mért abszorbancia változásokat beillesztettem a létrehozott modellekbe és összehasonlítottam a mikrobák MÜC-ben létrehozott fajlagos elektromos áramtermelésével és elektromos kapacitásokkal. A validáció során kapott determinációs koefficienseket és átlagos négyzetes hiba gyök értékeket az 5. táblázatban szemléltetem.

5. táblázat: A validációs kísérletek eredményei

Modell	R ²	RMSE
Modell 1.	0,855	1,91
Modell 2.	0,846	1,97
Modell 3.	0,769	8,91

Az 5. táblázat eredményei alapján látható, hogy mind a három modell alkalmazásával megfelelően prediktálható a mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramerőssége. Továbbá, 10⁶ TKE/ml vagy annál nagyobb beoltási sejtkoncentráció esetén a beoltási sejtkoncentráció elhagyható a modellből.

6.2 Mikroorganizmusok elektrogén profiljának meghatározása

Az elektrogén profil az egyes mikroorganizmusok mikrobiális üzemanyagcellában való alkalmazhatóságát írja le. A szakirodalomban fellelhető tanulmányok számos mikroba tulajdonságot hoznak összefüggésbe az elektromos áramtermeléssel, mint például a tapadási (biofilm) tulajdonságok vagy a redox mediátor képzést. Kutatómunkám során két eltérő fiziológiai tulajdonságú mikroba fajt (*Geobacter toluenoxydans* és *Shewanella xiamenensis*) vizsgáltam. Azért esett a választás ezekre a mikroorganizmusokra, mert jelenleg nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre e mikroba csoport szubsztrátum-hasznosításával, vas-redukciós képességével és mikrobiális üzemanyagcellában való alkalmazásával kapcsolatban. A *Geobacter toluenoxydans* esetében csak az anaerob szaporodási és a vas(III)-redukciós képességeket vizsgáltam. A *Shewanella xiamenensis* esetében a szaporodási és vas(III)-redukciós képességek mellett a szubsztrátum hasznosítási, tapadási, riboflavin és vezetőképességű fehérje termelési képességeket is vizsgáltam.

6.2.1 *Geobacter toluenoxydans* elektrogén profiljának meghatározása

6.2.1.1 Szaporodás-kinetikai vizsgálat

Geobacter toluenoxydans esetében a szaporodás-kinetikai vizsgálatokhoz nátrium-acetátot alkalmaztam szénforrásként. A korábban *G. metallireducens* és *G. sulfurreducens* fajokkal végzett előzetes kísérletek tapasztalatai alapján a Na-acetát megfelelően hasznosult, így feltételeztem, hogy a *G. toluenoxydans* is képes erre. A vizsgálatokhoz különböző nátrium-acetát koncentrációjú (0,5 g/l-től 3 g/l-ig 0,5 g/l-ként növelve a koncentrációt) tápközegeket alkalmaztam. A szaporodási görbék alakja, valamint a maximális fajlagos szaporodási sebességek jelentős különbségeket mutattak a koncentráció-növelés függvényében. A nátrium-acetát koncentráció 0,5 g/l-ről 1 g/l-re növelése következtében jelentősen nőtt a sejtszám. A 2,5 g/l-es Na-acetát koncentráció

esetében azonban az OD_{600nm} értékek változása csupán 0,063 volt a kísérletek ideje alatt (126 óra), így megállapítható, hogy a tápközeg Na-acetát koncentrációjának tovább növelése egyértelműen gátolja a mikrobák szaporodását.

A fellépő szubsztrátum inhibíció miatt az általánosan alkalmazott Monod modell nem képes teljes mértékben leírni a *G. toluenoxydans* szaporodási kinetikáját Na-acetát szubsztrátum esetében, ezért más Monod összefüggésen alapuló mikroba szaporodási modelleket használtam a szaporodás leírására. A modell illesztések statisztikai eredményei alapján azt tapasztaltam, hogy a LUONG és munkatársai (1987) által közölt összefüggéssel jobban írható le a mikrobák szaporodásának és a szubsztrátum mennyiségének kapcsolata. Az egyenlet a következő:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{S}{S_{max}}\right)^n$$

ahol,

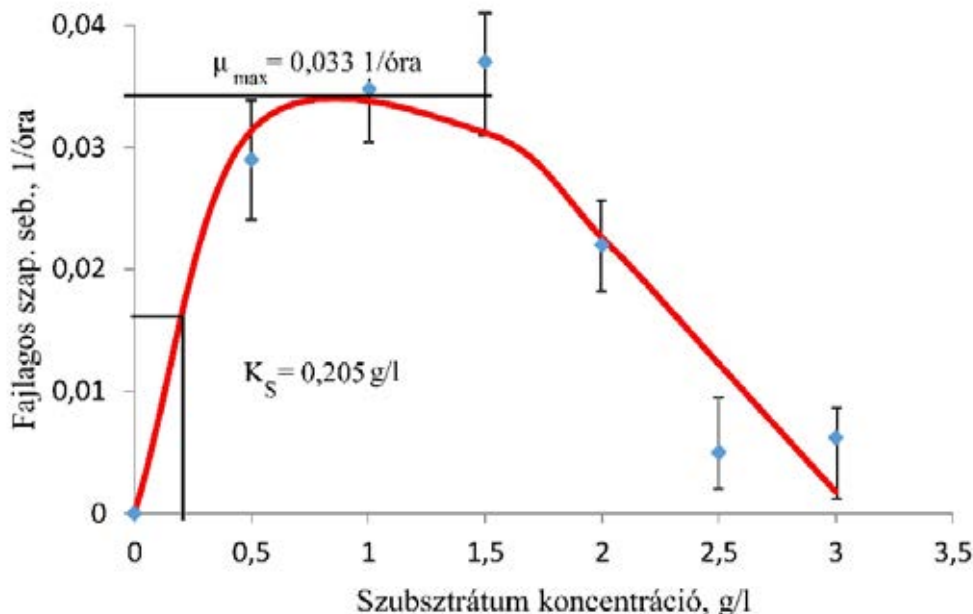
μ a specifikus (fajlagos) maximális szaporodási sebesség

μ_{max} a maximális szaporodási sebesség, S a szubsztrátum koncentráció

K_S a Monod-konstans

S_{max} a maximális szubsztrátum koncentráció, ahol a specifikus maximális szaporodási sebesség nullára csökken és n az egyenlet konstansa.

Ez az egyenlet tulajdonképpen a Monod modellen alapszik egy inhibíciós tényezővel kiegészítve. A modell létrehozására nem-lineáris görbeillesztési eljárást alkalmaztam a legkisebb négyzetek elvén (általánosított redukált gradiens módszer, Excel Solver bővítmény), aminek segítségével meghatározhattam a modell konstansait. A létrehozott modellt a 24. ábra szemlélteti.



24. ábra: A *G. toluenoxydans* szaporodás kinetikai modellje Na-acetát szubsztrátum esetén

Megállapítottam, hogy az inhibíciós modell a következő kinetikai konstansokkal írható le:

$$\mu_{\max} = 0,100 \text{ 1/óra}; K_S = 0,81 \text{ g/l}; n = 1,1; S_{\max} = 3,10 \text{ g/l}.$$

A létrehozott modell illeszkedését regressziós elemzéssel ellenőriztem. A statisztika szerint az illesztett modell determinációs koefficiense (R^2) 0,899 értékű ($p=0,044$) volt, ami a megfelelő illesztést feltételezi 5%-os elsőfajú hiba mellett. Az 1,5 g/l szubsztrátum koncentrációnál kiugró értékek figyelhetők meg. A kiugró értékek modellre gyakorolt torzító hatását statisztikai módszerekkel (Cook távolság, determinációs koefficiens változás) vizsgáltam. Megállapíthattam, hogy habár a 1,5 g/l-es értékek kiugróak voltak, mégsem torzították szignifikánsan a modellt.

Észrevehető, hogy a Luong modell μ_{\max} és K_S konstansai jelentősen nagyobbak, mint amit a méréseink eredményeztek. Ennek az a magyarázata, hogy a Luong modellben a μ_{\max} és K_S konstansok nem függenek az inhibíciótól, így szükséges a maximális szaporodási sebesség és a Monod-konstans értékek korrigálása. A korrigált konstansok a következők:

$$\mu_{\max, \text{korr}} = 0,033 \text{ 1/óra},$$

$$K_{S, \text{korr}} = 0,205 \text{ g/l}.$$

A Luong modell információval szolgál arról, hogy mekkora az a szubsztrátum koncentráció, amely már teljes mértékben gátolja a mikrobák szaporodását (S_{\max}). Esetemben az tapasztalható, hogy ha a tápközeg 3,1 g/l-es koncentrációnál nagyobb mennyiségben tartalmaz nátrium-acetátot, akkor a mikrobák képtelenek a szaporodásra. Habár kísérleteim során 3 g/l

szubsztrátum koncentrációjánál még észlelhető volt a baktériumok szaporodása, csak korlátozott mértékben, így $S_{\max}=3,1$ g/l-es értéket elfogadhatónak tartom.

Geobacter fajok általánosan fellelhetőek az oxigénhiányos édesvízi (STRAUB *et al.*, 2004) és tengeri üledékben (WANG *et al.*, 2009b), amelyek fontos szerepet töltenek be az ökoszisztémában. Általában „lassan szaporodó” mikroorganizmusokként jellemzik ($\mu_{\max}=0,01-0,09$ 1/óra) (ESTEVE-NÚNEZ *et al.*, 2005) őket, így több tanulmány is céljával tűzte ki a felszaporítási idejének csökkentését különböző tenyésztési módszerekkel (COPPI *et al.*, 2001; KIM és LEE, 2010; LOVLEY és PHILLIPS, 1988). Munkámban, a *G. toluenoxydans* maximális fajlagos szaporodási sebessége 0,033 1/óra volt, amely hasonló a más *Geobacter* fajok (*G. sulfurreducens* vagy *G. metallireducens*) esetében tapasztalt értékekhez. Inhibíciós szaporodási kinetikát *Geobacter* fajok esetén ez idáig nem mutattak ki más tanulmányok (ESTEVE-NÚNEZ *et al.*, 2005). Ennek az lehet az oka, hogy a vizsgálatok során alkalmazott szubsztrátum (Na-acetát) koncentrációja nem érte el az inhibíciós értéket.

6.2.1.2 Fe³⁺-redukciós képesség vizsgálata

FENG és munkatársai (2013) tanulmánya, valamint saját kutatásaim (SZÖLLÖSI *et al.*, 2015b) is megerősítik, hogy szoros kapcsolat tételezhető fel a mikrobás vas(III)-redukció és az extracelluláris elektrontermelés (bio-elektromos áram) között. Ebből a megfigyelésből kiindulva következtetéseket vontam le a mikroba mikrobiális üzemanyagcellában való alkalmazhatóságáról a Fe³⁺-redukciós tulajdonságok ismeretében.

Ennek értelmében a *G. toluenoxydans* vas(III)-redukcióját vizsgáltam különböző Na-acetát koncentrációjú tápközegekben.

A 460 nm-en mért abszorbancia változás alapján létrehozott vas-redukciós görbéken megfigyelhetők a szaporodási görbék jellegzetes szakaszai (lappangási, gyorsuló, exponenciális, lassuló és stacioner szakasz), azonban a szubsztrátum mennyiségének hatására a fázisok hossza és meredeksége jelentősen különbözik az elméleti szaporodás lefutásától. A beoltást követő időszakban megfigyelhető a lappangási szakasz, ahol a vas(III)-ionok fogyása mérhető, de nem jelentős. Az exponenciális fázisban gyorsuló vas(III)-redukció észlelhető, azonban a szaporodási görbével ellentétben nem észlelhető tipikus stacioner szakasz. Ennek alapján arra következtethetünk, hogy a Fe³⁺-redukció kinetikája nem feltétlenül a szaporodáshoz kötött.

Jelentős különbségeket fedezhettem fel a szaporodási tulajdonságokban a szubsztrátum koncentrációjának növelésével (25. ábra). Várakozásomnak megfelelően a tápközeg Na-acetát koncentrációjának 1,0 g/l koncentrációig való növelése a vas(III)-redukció sebességének növekedését eredményezte, azonban a további szubsztrátum hozzáadása már csökkentette ezt. Az

eredmények alapján a mikroba vas(III)-redukciója esetében is feltételezhető szubsztrátum-inhibíció (25. ábra).

A mikroba vas(III)-redukciós kinetikájának jellemzésére számos a szakirodalomban publikált modellt vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a modellek közül a HALDANE és munkatársai (1930) által közölt összefüggéssel írható le a legkisebb hibával (legkisebb négyzetek módszere alapján) a *G. toluenoxydans* Fe³⁺-redukciója. A modell a következő:

$$\mu^P = \mu^P_{max} \cdot \frac{S}{(S + K_S)(S/K_{SI})}$$

ahol:

μ^P : specifikus Fe³⁺-redukciós sebesség, mg/óra

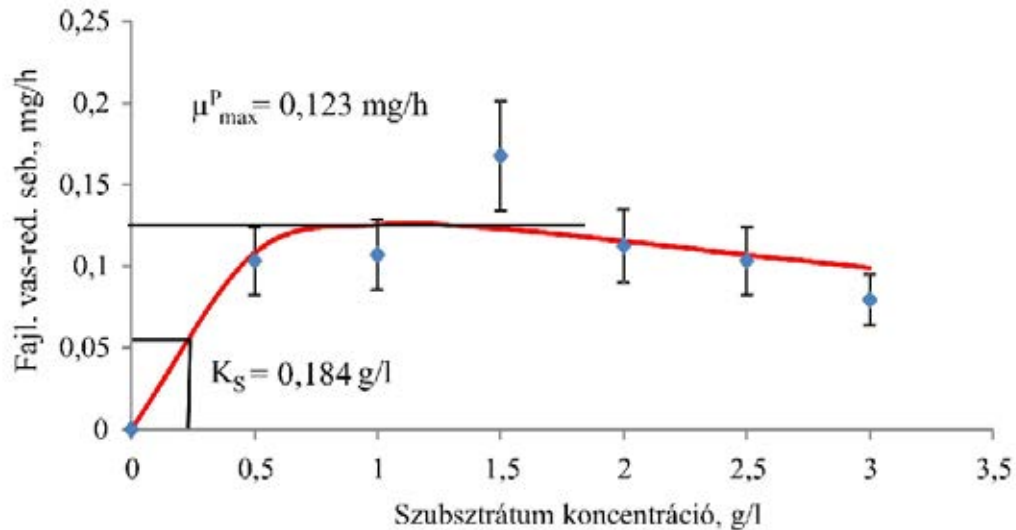
μ^P_{max} : maximális Fe³⁺-redukciós sebesség, mg/óra

S: szubsztrátum koncentráció, g/l

K_S : Monod-konstans, g/l

K_{SI} : szubsztrátum inhibíciós konstans, g/l

A létrehozott modellt a 25. ábra szemlélteti.



25. ábra: A *G. toluenoxydans* vas(III)-redukciós modellje Na-acetát szubsztrátum esetén

Az alkalmazott modell a következő kinetikai konstansokat tartalmazza:

$\mu^P_{max} = 0,5 \text{ mg Fe}^{3+}/\text{óra}$,

$K_S = 1,103 \text{ g/l}$,

$K_{SI} = 1,104 \text{ g/l}$.

A szaporodás kinetikai modell vizsgálatokhoz hasonlóan ebben az esetben a korrekciós számítást is szükségesnek tartottam. A korrigált kinetikai konstansok a következők:

$$\mu_{\max, \text{kor}}^P = 0,123 \text{ mg Fe}^{3+}/\text{óra},$$

$$K_{S, \text{kor}} = 0,184 \text{ g/l}.$$

A regressziós diagnosztika szerint a modell illeszkedése megfelelő, hiszen a determinációs koefficiens (R^2) értéke 0,81 ($p=0,0052$, $\alpha=0,05$) volt.

A Haldane modell - a Loung modellel ellentétben - arról a szubsztrátum koncentrációról ad információt, amikor a szubsztrátum inhibíció először jelentkezik. Megállapítottam, hogy a 1,104 g/l koncentrációnál nagyobb mennyiségű Na-acetát szubsztrátum már gátlón hat a *G. toluenoxydans* mikroba vas(III)-redukciójára.

A vas(III)-redukciós vizsgálat abszorbancia-változásai alapján becsülhető a mikrobiális üzemanyagcellából kinyerhető maximális fajlagos elektromos áram nagysága és az üzemanyagcella elektromos kapacitása (SZÖLLÖSI *et al.*, 2015b). Az abszorbancia-változás értékeket, a modellekből származtatott becsléseket és az üzemanyagcellával végrehajtott mérések eredményeit különböző Na-acetát koncentrációk esetében a 6. táblázat szemlélteti.

6. táblázat: A mért vas-redukció alapján számolt és mért elektromos paraméterek

Na-acetát koncentráció	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	2,5 g/l	3 g/l
Absz. vált. (48 óra alatt)	0,241	0,231	0,656	0,427	0,146	0,135
Absz. vált. exp. fázisban	0,126	0,145	0,426	0,241	0,120	0,042
Modell 2*, mA/m ²	10,0	10,8	23,8	15,2	9,7	6,1
Modell 3**, mA/m ² ·48 óra	220	210	631	405	127	116
Mért fajlagos áramerősség, mA/m ²	-	9,2	-	18,8	-	-
Mért kapacitás, mA/m ² ·48 óra	-	232	-	396	-	-

*A Fe³⁺-redukciós teszt eredménye alapján létrehozott fajlagos elektromos áram modell az abszorbancia változás függvényében (4.1.1.4. fejezet)

**A Fe³⁺-redukciós teszt eredménye alapján létrehozott elektromos kapacitás modell a 48 óra alatt bekövetkező abszorbancia változás függvényében (4.1.1.4. fejezet)

A vas(III)-redukciós vizsgálat során meghatároztam a mikroba várható elektromos kapacitás értékeit a 48 óra alatt bekövetkező abszorbancia változás alapján. Azt tapasztaltam, hogy a különböző Na-acetát koncentrációk jelentősen befolyásolják a MÜC kapacitását. Míg 0,5 g/l és 1 g/l szubsztrátum koncentráció esetén közel azonos kihozatal várható, addig a 2 g/l-es Na-acetát több, mint kétszeresére, a 1,5 g/l-es pedig háromszorosára növelheti az üzemanyagcella által létrehozott elektromos kapacitást. A 2,5 g/l és 3 g/l esetén a szubsztrátum gátlás hatására a várható elektromos áramtermelés alacsonyabb lett.

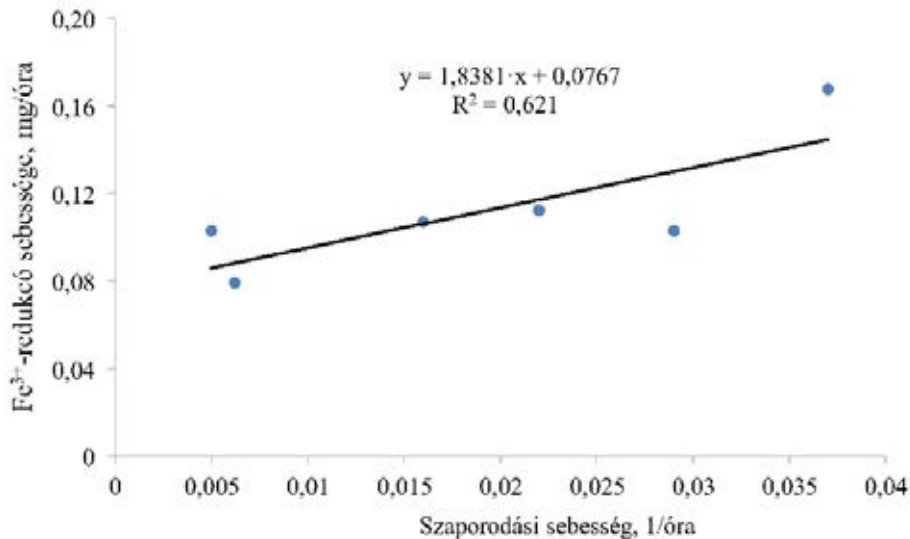
Ez a trend megfigyelhető a várható fajlagos elektromos áramerősség értékeknél is. A modell predikciója szerint a legnagyobb áramerősség ($23,8 \text{ mA/m}^2$) az $1,5 \text{ g/l}$ -es Na-acetát koncentráció esetében figyelhető meg. Az ettől eltérő acetát koncentrációk visszaesést tételeznek fel a kapacitáshoz hasonlóan.

Az eredmények megerősítése érdekében mikrobiális üzemanyagcella méréseket hajtottam végre 1 és 2 g/l -es Na-acetát szubsztrátum koncentrációt alkalmazva. Az eredmények megfelelő egyezést mutattak, mind a fajlagos elektromos áramtermelés, mind az elektromos kapacitás prediktált és mért értéke között, azaz megerősítette a következtetéseimet. Megjegyzendő, hogy a szakirodalomban fellelhető *Geobacter* fajokkal végzett kísérletek során lényegesen magasabb fajlagos elektromos áram értékeket értek el (JUNG és REGAN, 2007). Ez az ellentmondás feloldható, ha ismerjük a *Geobacter*-ek elektromos áramképzési tulajdonságait. A legtöbbet kutatott *Geobacter sulfurreducens* esetében bebizonyították, hogy vastag elektromosan vezetőképes biofilmet képes létrehozni a mikrobiális üzemanyagcella anódjának felületén (BOND és LOVLEY, 2003). amely elengedhetetlen nagyhatékonyságú MÜC-rendszer kialakításához (PICIOREANU *et al.*, 2007). A több sejtsoros biofilm kialakulása azonban még optimális körülmények között is akár hetekig eltarthat. Gyors módszerünk esetén a vas(III)-ionok komplex kötésben voltak, így nem alakulhatott ki rajtuk biofilm, továbbá a mérés ideje is csupán 48 óra volt.

6.2.1.3 Szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságok kapcsolata

Ahogy korábban említettem a mikrobák szaporodási és Fe^{3+} -redukciós tulajdonságai több szempontból is hasonló kinetikát mutatnak, így feltételezhető kapcsolat a két élettevékenység között. A szaporodás és vas(III)-redukció összefüggéseinek kimutatására a LUEDEKING és PIET (1959) által kidolgozott eljárást alkalmaztam. Ábrázoltam a termékképzési sebességet (ebben az esetben a vas(III)-ionok fogyásának sebességét) a szaporodási sebesség függvényében különböző szubsztrátum koncentrációk alkalmazásával. Ezt követően regressziós egyenest illesztettem és az egyenletek együtthatóival jellemeztem az összefüggést.

Az illesztett egyenes meredeksége (α) azt jellemzi, hogy a vas(III)-redukció milyen mértékben függ a mikroorganizmus szaporodási sebességétől. Ha a meredekség nulla közeli érték, akkor a mikrobás vas(III)-redukciót függetlenek mondhatjuk a szaporodástól, míg ha nullától eltérő, akkor kapcsolatot feltételezhetünk. Az egyenes ordináta-tengelymetszete (β) a sejtmennyiség szerepét mutatja a vas(III)-redukcióban. Ha ennek az értéke nullához közeli akkor nem függ a sejtek számától a vas(II) képződés, míg ha szignifikánsan nagyobb, mint nulla, akkor szintén kapcsolat feltételezhető.



26. ábra: A *G. toluenoxydans* szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságainak kapcsolata Na-acetát szubsztrátum esetén (SZÖLLŐSI *et al.*, 2015a)

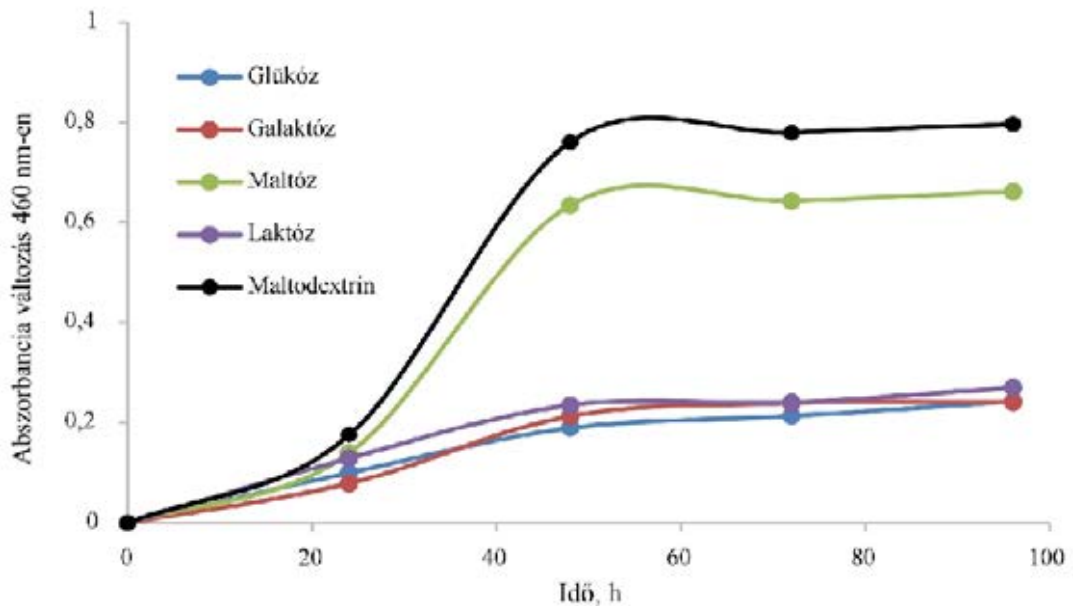
A *Geobacter toluenoxydans* szaporodási és vas(III)-redukció sebességének összefüggését a 26. ábra szemlélteti. A vizsgálathoz a szaporodási és vasredukciós kinetikánál alkalmazott szubsztrátum koncentrációkat alkalmaztam (0,5-3 g/l). Az egyenes meredeksége 1,838, így szoros kapcsolatot feltételezhetünk a mikrobák szaporodása és a vas(III)-ion fogyás között. Megállapítottam, hogy az egyenes ordináta metszete nem nulla (0,0767, ami a teljes értéktartomány 38%-a), így feltételezhető, hogy a sejttömegnek jelentős szerepe van a vas(III)-ionok redukciójában. Az eredményeket összefoglalva, a mikroba szaporodási sebessége és a tenyészet sejttömege is jelentősen befolyásolja az extracelluláris elektronok képződését *G. toluenoxydans* esetében.

6.2.2 *Shewanella xiamenensis* elektrogén profiljának meghatározása

6.2.2.1 Szubsztrátumok hatása az extracelluláris elektrontermelésére

A szigorú anaerob körülmények között vas(III)-ionok jelenlétében történő szubsztrátum-hasznosítási vizsgálatokat csak a *S. xiamenensis* esetében végeztem el. Aerob körülmények között az *S. xiamenensis* típus törzs szénhidrát hasznosítási tulajdonságairól elsőként HUANG és munkatársai (2010) számoltak be. Anaerob körülmények esetén, különböző elektron-akceptorok jelenlétében, atonban feltételezhetően megváltoznak az anyagcsere utak. Munkámban különböző mono- (glükóz, galaktóz), di- (maltóz, laktóz) és oligoszacharidokat (maltodextrin) alkalmaztam elektron-donorként és Fe³⁺-citrátot elektron-akceptorként. A szénhidrát hasznosítást a vas(III)-

ionok koncentrációjának csökkenésével (a 460 nm-en mért abszorbancia változás) követtem nyomon (27. ábra).



27. ábra: *S. xiamensis* vas(III)-redukciója különböző szubsztrátumok esetében 1 g/l szubsztrátum koncentrációt alkalmazva

A kísérleteket minden szubsztrátum esetén 1 g/l-es szénhidrát koncentrációval végeztem 3 párhuzamos méréssel. A különböző szénhidrátok hatására jelentős változások figyelhetők meg a mikroba vas(III)-redukciós képességében. A 27. ábra jól szemlélteti, hogy az alkalmazott szénhidrátokat két csoportba lehet osztani. Az első 24 órában a vas(III)-tartalom közel azonos volt minden szubsztrátum esetében, azonban a 48 órás mintavételnél már jelentős eltéréseket mutatott a vas(III)-ionok koncentrációja. Intenzív Fe^{2+} koncentráció növekedést figyeltem meg a maltóz és a maltodextrin esetében, míg az elsődleges energiaforrásként szolgáló glükóz esetében kis mértékű volt a vas-redukció. A többi szénhidrát esetében a glükózhoz hasonló vas(III)-redukció ment végbe.

Több *Shewanella* faj esetén is megfigyelték, hogy a mikroba egyáltalán nem (pl. *S. gelidimarina*, *S. putrefaciens*) vagy gázképződés nélkül képes hasznosítani a glükózt (BOWMAN *et al.*, 1997). Ezzel szemben a *S. xiamensis* DSMZ 22215 törzs esetén nem tapasztaltam a fermentlé jelentős pH változását, ami kevert savas fermentációra utalna. A maltóz és a maltodextrin glükóz egységekből épül fel és csupán polimerizáltsági fokukban különböznek egymástól, így a glükózon is hasonló redukciós profilt kellett volna mutatnia a mikrobának, mint a maltózon és a

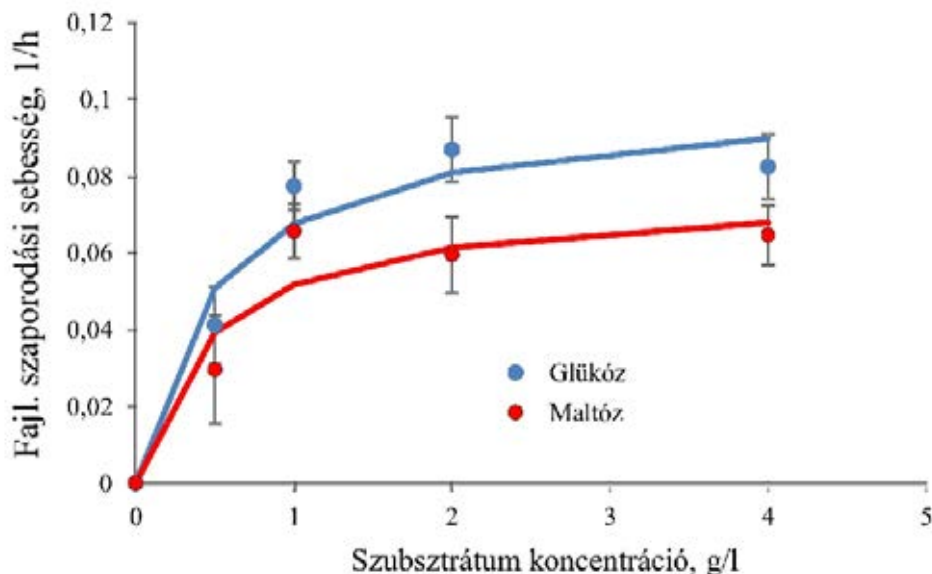
maltodextrinen. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a terminális elektron-akceptorok minősége (oxigén, Fe^{3+} -ionok) jelentősen befolyásolja a mikroba szubsztrátum-hasznosítását.

6.2.2.2 Szaporodás-kinetikai vizsgálat

A *Shewanella xiamenensis* esetében két szubsztrátum alkalmazásával vizsgáltam a mikroba szaporodás-kinetikai tulajdonságait. Az előzetes vizsgálatok alapján, maltózon és glükózon eltérő a mikroorganizmus vas(III)-redukciós képessége, így ezeket a szénhidrátokat választottam a szaporodás-kinetikai vizsgálatokhoz. A két szén-forrást 0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l és 4 g/l koncentrációban adtam a minimál tápközeghez. A mikrobák szaporodását lemezöntéssel követtem nyomon az élő sejtszám meghatározásához.

A maximális fajlagos szaporodási sebességet és a Monod konstansokat Lineweaver-Burk linearizációs módszerrel határoztam meg. A modell megfelelést regressziós elemzéssel ellenőriztem. Glükóz esetében $R^2=0,944$ ($p=0,005$), míg maltóz esetén $R^2=0,908$ ($p=0,012$) determinációs koefficiens mutatott a statisztika, ami megfelelő illesztést feltételez. A modell alapján a μ_{\max} glükóz esetén 0,121 1/órának, míg maltóz esetében 0,096 1/órának adódott. Megállapítottam, hogy habár eltérnek egymástól a maximális szaporodási sebességek a különböző szubsztrátumoknál, az eltérések mégsem tekinthetők jelentősnek. A Monod konstansok (K_s) 0,893 és 1,001 g/l értékek voltak, amelyek szintén csekély mértékben térnek el egymástól.

Glükóz szubsztrátumon a specifikus szaporodási sebesség értékek 0,041-0,087 1/óra tartományban változtak, míg maltóz szénforrásnál az eredmények 0,03-0,066 1/óra között találhatóak (28. ábra). A szubsztrátum koncentráció növelése a fajlagos szaporodási sebesség növekedéséhez vezetett, azonban 1 g/l-t meghaladó szubsztrátum koncentráció esetén már lassuló tendencia figyelhető meg.



28. ábra: A *S. xiamenensis* szaporodás kinetikai modelljei glükóz és maltóz szubsztrátum esetén

A különbségek kimutatására t-próbát végeztem az azonos koncentrációjú glükózt és maltózt tartalmazó minták fajlagos szaporodási sebesség értékei között (kétmintás t-próba, $p < 0,05$). A t-próba eredménye szignifikáns különbséget ($p = 0,033$) mutatott 2 és 4 g/l-es szubsztrátum koncentrációknál, így megállapítható, hogy nagyobb a fajlagos szaporodási sebesség glükóz szubsztrátumon, mint maltózon.

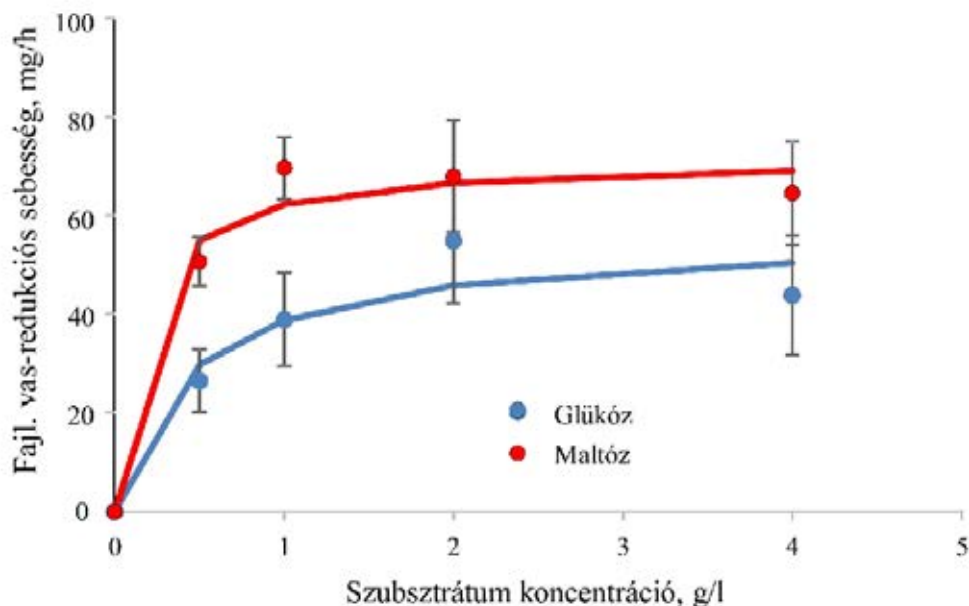
6.2.2.3 Fe^{3+} -redukciós képesség vizsgálata

Meghatároztam a *Shewanella xiamenensis* vas(III)-redukciós kinetikai paramétereit a glükóz és maltóz szubsztrátum esetén Lineweaver-Burk linearizációs módszerrel. A szaporodás kinetika eredményével ellentétben a vas(III)-redukciója során a maltóz szubsztrátum eredményezett nagyobb maximális redukciós sebességet (73,6 mg Fe^{2+} /óra), mint glükóznál (62,5 mg Fe^{2+} /óra). A K_S glükóz esetén 0,717 g/l, míg maltóznál 0,196 g/l volt. Ez azt jelenti, hogy mikroba számára termékképzés szempontjából a maltóz szubsztrátum affinitása kedvezőbb. Regressziós analízissel megállapítottam, hogy a determinációs koefficiens glükóz esetében $R^2 = 0,93$ ($p = 0,005$, $\alpha = 0,05$), míg maltóz esetén $R^2 = 0,90$ ($p = 0,01$, $\alpha = 0,05$) volt, így az általam felállított modellt megfelelő illesztésűnek tartom.

A vizsgálat eredményei alapján jelentős különbségek fedezhetők fel a két szubsztrátum hatására létrejött vas(III)-redukció kinetikájában (29. ábra). A glükóz szénforráson a Fe^{3+} -redukció sebessége 26,5-54,8 mg/óra értéktartományban változott és a szubsztrátum koncentráció

növelésével a vas(III)-ionok fogyása is intenzívebbé vált. A legnagyobb redukciós sebességet 2 g/l kezdeti szubsztrátum koncentrációnál mértem (54,8 mg/óra). Azt tapasztaltam, hogy 2 g/l-nél nagyobb glükóz koncentráció csak csekély hatást gyakorolt a vas(III)-redukcióra.

Maltóz szubsztrátumnál nagyobbak voltak a vas(III)-redukciós értékek, mint a glükóz esetében. Az eltérés a 0,5 g/l és 1 g/l-es szénhidrát koncentrációkban volt a legnagyobb (a különbség 0,5 g/l-es koncentrációk esetén 24,1 mg/h, míg 1 g/l-es koncentrációknál 30,7 g/l). Maltóz szubsztrátumon a vas-redukció sebessége 50,6-69,6 mg/óra értékek között változott. A legintenzívebb redukciós tevékenységet 1 g/l-es maltóz koncentrációnál tapasztaltam (69,6 mg/óra). További maltóz koncentráció növelés nem gyakorolt jelentős hatást a mikrobiális Fe³⁺-redukcióra.



29. ábra: A *S. xiamenensis* vas(III)-redukciós kinetikai modellje glükóz és maltóz szubsztrátum esetén

A vas(III)-redukció sebessége mellett a vas(III)-ionok hasznosításában is jelentős különbségeket fedeztem fel a két szubsztrátum esetén. Maltóz szubsztrátumon csaknem a teljes hozzáadott Fe³⁺ mennyiség elredukálódott (körülbelül 91%), glükóz tartalmú tápközegekben több vas(III)-ion maradt a vizsgálat végéig (körülbelül 42%).

Ezt a különbséget kétmintás t-próbával is megerősítettem (*t*-próba, $p < 0,05$). A statisztikai eredmények alapján a legnagyobb eltérés a 0,5 g/l ($p = 0,0032$, $\alpha = 0,05$) és az 1 g/l-es ($p = 0,00094$, $\alpha = 0,05$) szubsztrátum koncentrációnál detektálható.

A vas(III)-redukciós vizsgálat alapján becsültem a mikrobiális üzemanyagcellából kinyerhető maximális fajlagos elektromos áram nagyságát és az üzemanyagcella elektromos

kapacitását. Az abszorbancia változás értékeit, a modellekből származtatott becsléseket és az üzemanyagcellával végrehajtott mérések eredményeit a 7. táblázat szemlélteti.

7. táblázat: A mért vas-redukció alapján számolt és mért elektromos paraméterek

Szubsztrátum koncentráció	Glükóz				Maltóz			
	0,5 g/l	1 g/l	2 g/l	4 g/l	0,5 g/l	1 g/l	2 g/l	4 g/l
Absz. vált. 48 óra alatt	0,267	0,320	0,471	0,488	0,710	0,816	0,824	0,920
Absz. vált. exp. fázisban	0,098	0,140	0,251	0,240	0,621	0,716	0,602	0,701
Modell 2*, mA/m ²	8,7	10,6	15,7	14,3	32,8	37,1	31,9	36,5
Modell 3**, mA/m ² ·48 óra	246	299	448	465	684	789	797	892
Mért fajlagos áramerősség, mA/m ²	-	7,5	18,3	-	-	33,2	34,6	-
Mért kapacitás, mA/m ² ·48 óra	-	287	451	-	-	797	801	-

* A vas(III)-redukciós teszt eredménye alapján létrehozott fajlagos elektromos áram modell az abszorbancia változás függvényében (4.1.1.4. fejezet)

**A vas(III)-redukciós teszt eredménye alapján létrehozott elektromos kapacitás modell a 48 óra alatt bekövetkezett abszorbancia változás függvényében (4.1.1.4. fejezet)

Az eredmények alapján becsült elektromos kapacitás és fajlagos elektromos áram értékek jelentősen különböztek a két szénforrásnál. Az egyes szubsztrátumok különböző koncentrációjánál azonban a különbségek nem olyan nagymértékűek (7. táblázat). Glükóz esetén a szubsztrátum koncentráció növelésével arányosan növekedett a várható fajlagos elektromos áram mértéke is a 2 g/l-es koncentrációig. A szubsztrátum koncentráció további növelése már nem okoz szignifikáns növekedést a MÜC elektromos áramtermelésében. A elektromos kapacitás értékek esetében a szubsztrátum koncentráció növelésével egyértelműen nőtt a MÜC várható elektromos kapacitása.

Az eredmények megerősítésére méréseket hajtottam végre mikrobiális üzemanyagcellát alkalmazva, 1 és 2 g/l-es glükóz és maltóz szubsztrátum koncentrációval. Megállapítottam, hogy mind a fajlagos elektromos áramtermelés, mind az elektromos kapacitás prediktált és mért értékei közel esnek egymáshoz.

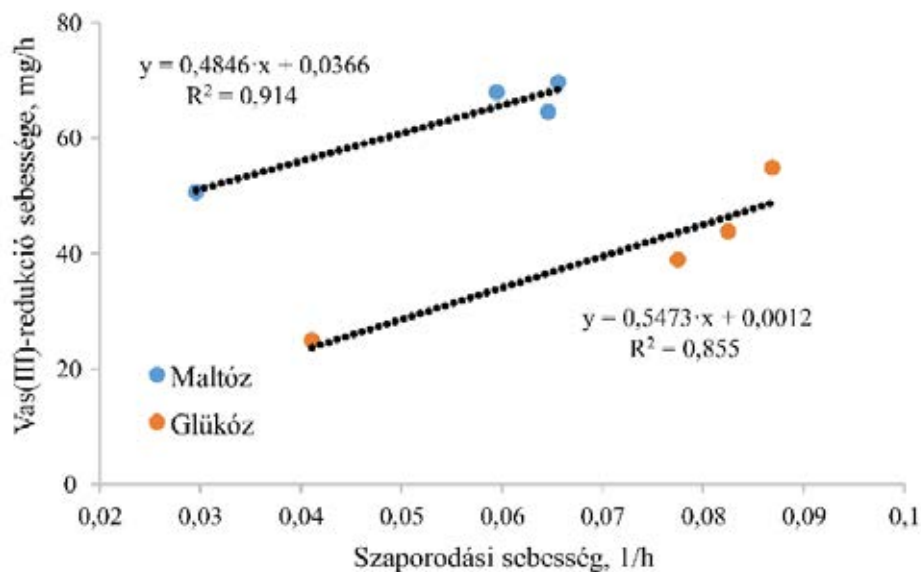
A szakirodalomban fellelhető *Shewanella* törzsekkel végzett kísérletek hasonló fajlagos elektromos áram eredményeket (5-50 mA/m²) mutatnak (WATSON és LOGAN, 2010). Egyes esetekben azonban az üzemanyagcella elektród fejlesztésének következtében akár egy vagy két nagyságrenddel nagyobb értékek is elérhetők (PARK és ZEIKUS, 2003). Eredményeim alapján feltételezhető, hogy megfelelő cella kialakítással, valamint maltóz szubsztrátum alkalmazásával, hatékony üzemanyagcella rendszer hozható létre.

6.2.2.4 Szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságok kapcsolata

Megvizsgáltam a vas(III)-redukciós képesség és a szaporodás közötti összefüggést mind a glükóz mind a maltóz szubsztrátumon. A vizsgálatához 0,5-4 g/l szubsztrátum koncentráció tartományt alkalmaztam. Az 30. ábrát szemlélve megállapíthatjuk, hogy az illesztett egyenesek értékeikben nagymértékben különböznek egymástól.

Glükóz szénforrásnál a meredekség egyértelműen nem nulla (0,547), így a szaporodási sebességnek hatása van az extracelluláris elektronok termelésére. Viszont az ordináta metszete 1,2 mg/óra, ami egy nagyságrenddel kisebb, mint a legkisebb vas-redukciós sebesség értéke (20 mg/óra), így ez nullának tekinthető. Ennek alapján az aktuális sejtszám nem mutatott szignifikáns hatást a vas(III)-redukcióra.

Maltóz szubsztrátum esetén eltérő összefüggéseket tapasztaltam. A regressziós egyenes meredeksége egyértelműen nem nulla (0,48), azonban az ordináta tengelymetszete a vas(III)-redukciós sebességek érték tartományában van (0,037), így ez sem tekinthető zérusnak. Ez alapján megállapítható, hogy a szaporodási sebesség és a tenyészet sejtmennyisége is egyaránt befolyásolja a termékképzést (vas-redukciót).



30. ábra: A *S. xiamenensis* szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságainak kapcsolata glükóz és maltóz szubsztrátum esetén

Az elért eredmények alapul szolgálhatnak különböző típusú mikrobiális üzemanyagcella rendszerek tervezéséhez *G. toluenoxydans* és *S. xiamenensis* mikrobák alkalmazásával. Továbbá a nátrium-acetátot használó *G. toluenoxydans* és a maltóz alapú *S. xiamenensis* MÜC-rendszerben

a megfelelő élő sejtömeg elérése fontos feltétel az optimális elektromos áramtermeléséhez, míg glükóz esetében ez csak a szaporodástól függ.

6.2.3 Extracelluláris elektron közvetítő képzés vizsgálata

Az alkalmazhatóság egyik fontos szempontja, hogy képes-e a kiválasztott mikroba kultúra elektrokémiai közvetítőket (mediátorokat) termelni. A mediátorok lehetnek konduktív fehérjék vagy flavin típusú vegyületek, amelyek vizsgálatához a *Shewanella xiamenensis* fajt alkalmaztam. A mikrobát aerob és anaerob körülmények közt inkubáltam, valamint mikrobiális üzemanyagcellában.

6.2.3.1 Fehérje természetű elektron-közvetítő termelés

A minták fehérjetartalmának meghatározásához a 48 órás inokulumok felülűszóját izopropanolos kicsapással bekoncentráltam és 0,5 M-os Na-acetát pufferben reszuszpendáltam. A mérés után az extracelluláris fehérjetartalmat 10^7 TKE/ml sejtszámra vonatkoztattam. A kapott eredményeket a 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat: A különböző tenyésztések során mért fehérjetartalom és vezetőképesség értékek

Minta	Fehérjetartalom $\mu\text{g}/10^7$ TKE	Vezetőképesség, $\text{mS}/10^7$ TKE	Fehérjék relatív vezetőképessége, %
Aerob tenyésztés	$0,04 \pm 0,01$	0,0172	100
Anaerob tenyésztés	$2,47 \pm 0,05$	0,0267	163
MÜC	$11,71 \pm 0,05$	0,176	228

Az egyes kísérleti beállítások között jelentős eltérések figyelhetők meg. Az oxigén kizárása a tápközegből szignifikánsan megnövelte az extracelluláris fehérjék szekrécióját. Míg a levegőztetett minták esetében $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}/10^7$ TKE fehérje termelődött a felülűszóban, addig a mikrobiális üzemanyagcella anódterében $11,71 \pm 0,05 \mu\text{g}/10^7$ TKE és a Fe^{3+} -ionok jelenlétében $2,47 \pm 0,05 \mu\text{g}/10^7$ TKE mennyiségű fehérje került a tápközegbe.

A vezetőképesség méréseknél az értékeket a 0,5 M-os Na-acetát puffernél mért értékekkel korrigáltam. Az aerob minták elektromos vezetőképessége megközelítőleg megegyezett a puffer esetében mért eredménnyel ($0,0172 \text{ mS}/10^7$ TKE). A vas(III)-ionok jelenlétében történő inkubáció majdnem kétszeresére növelte a minta vezetőképességét ($0,0267 \text{ mS}/10^7$ TKE). A mikrobiális üzemanyagcellában levő minták $0,176 \text{ mS}/10^7$ TKE vezetőképesség értéket értek el, ami egy nagyságrenddel meghaladja a levegőztetett tenyészetek értékeit.

Az eredmények alapján egyértelműen megállapítható, hogy az oxigénmentes környezet jelentősen növelte a *Shewanella xiamenensis* extracelluláris fehérje szekrécióját. Ennek a magyarázata lehet, hogy a mikrobiális üzemanyagcellában uralkodó redox viszonyok pozitív hatást gyakorolnak az extracelluláris konduktív fehérjék mennyiségére és minőségére. Az üzemanyagcellában közel ötszörösére növekedett az extracelluláris fehérjék mennyisége a képzett fehérjék vezetőképessége pedig 39%-kal volt nagyobb, mint a Fe³⁺-ionok jelenlétében inkubált mintáké. A levegőztett minták esetében elért eredménynek ez a 228%-ka volt.

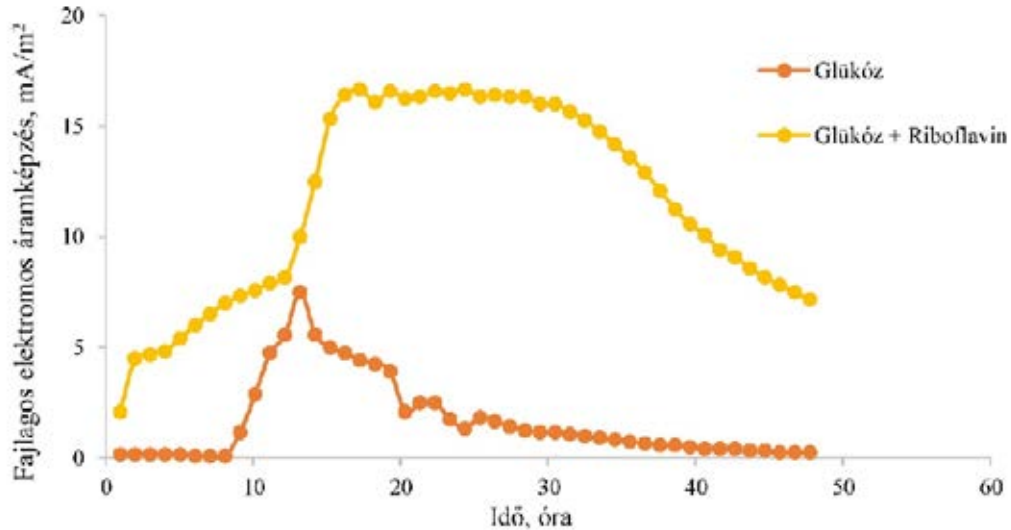
6.2.3.2 Riboflavin termelés és hatás a MÜC teljesítményére

A konduktív fehérjetermelés vizsgálata mellett vizsgáltam a *Shewanella xiamenensis* extracelluláris riboflavin képzését aerob, anaerob környezetben vas(III)-ionok hozzáadásával, valamint mikrobiális üzemanyagcellában is.

Megállapítottam, hogy minden tenyészet esetén kimutatható volt a riboflavin az extracelluláris térben, azonban a mikroba által termelt riboflavin mennyisége jelentősen változott a különböző környezeti tényezők hatására. Oxigén jelenlétében $0,17 \pm 0,01 \mu\text{g/ml} \cdot 10^7$ TKE riboflavint mértem a tenyészetből, míg anaerob feltételek mellett 50-szer nagyobb koncentrációban volt kimutatható (vas(III)-ionok hatására $8,38 \pm 0,05 \mu\text{g/ml} \cdot 10^7$ TKE, míg MÜC-ben $8,62 \pm 0,05 \mu\text{g/ml} \cdot 10^7$ TKE).

Az eredmények szerint az oxigénmentes (anaerob) környezet indukálja a baktériumok extracelluláris riboflavin képzését. Ennek oka, hogy a mikroba az anyagcsere során keletkezett redukált koenzimeket különböző sejten kívüli elektron-akceptorokkal tudja regeneráltatni, mivel a fermentációs közegben nem áll rendelkezésére elegendő oxigén a terminális oxidációhoz. VON CASTEIN és munkatársai (2008) kimutatták, hogy különböző *Shewanella* törzsek extracelluláris riboflavin termelése indukálható anaerob környezetben, ha megfelelő mennyiségű, elektron akceptorként szolgáló, vízben nem oldódó vas(III)-ionokat adnak a tápközeghez. A mikrobiális üzemanyagcellában való alkalmazás egyik fontos tényezője lehet az extracelluláris riboflavin képzés, hiszen hatékonyabbá tehető az elektrontranszport, így növelhető a cella teljesítménye.

Kutatásomban az exogén riboflavin hatását is vizsgáltam. Gyakorlatban riboflavint injektáltam a mikrobiális üzemanyagcella anódterébe.



31. ábra: A *S. xiamenensis* fajlagos elektromos áramtermelése riboflavin hozzáadásával és hozzáadása nélkül

A vizsgálat során kétkamrás mikrobiális üzemanyagcella rendszert riboflavin nélkül és 10 μM riboflavin hozzáadásával alkalmaztam, amelyben a *S. xiamenensis* bio-katalizátorként működött. A MÜC működtetésére glükóz szubsztrátumot használtam. A beállítások fajlagos elektromos áramtermelését a 31. ábra szemlélteti. A redox-mediátor nélküli MÜC beállításnál a beoltást követően a 8. órában kezdődött meg az elektromos áramtermelés és ebben az időpontban volt detektálható a maximális fajlagos elektromos áram ($7,5 \text{ mA/m}^2$), ezt követően folyamatosan csökkent az elektromos áram mennyisége. A 40. órában az elektromos áramtermelés gyakorlatilag megszűnt.

Amikor az anódtérben a glükóz szubsztrátumot 10 μM riboflavinnal egészítettem ki, az elektromos áramképzés jelentősen megváltozott. Az áramtermelés már a beoltást követően megkezdődött és a vizsgálat teljes ideje alatt tartott. A maximális fajlagos elektromos áram mennyisége $16,2 \text{ mA/m}^2$ -re növekedett, ami több mint kétszerese a mediátor nélküli összeállításnál mért értékeknek. A riboflavin tartalmú MÜC beállítás esetében a maximális elektromos áramtermelés időtartománya 15 órán keresztül tartott.

A vas(III)-redukciós vizsgálatoknál megfigyelt tapasztalatok alapján glükóz szubsztrátumon a *S. xiamenensis* kevésbé redukálta a vas(III)-ionokat, mint a maltózon. A glükózos MÜC beállításnál szintén alacsony volt a mikroba elektromos áramtermelése. HUANG és munkatársai (2010) publikációjukban arról számoltak be, hogy a *S. xiamenensis* anaerob körülmények között gázképződés nélküli fermentáció során hasznosítja a glükózt. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a riboflavin redox-mediátor hozzáadása jelentősen megváltoztatta a

mikroba metabolizmusát és növelte az extracelluláris elektronleadását (VELASQUEZ-ORTA *et al.*, 2011).

6.2.3.3 Tapadási tulajdonságok vizsgálata

Az egyes mikroorganizmusok a MÜC-ben való alkalmazhatóságát jelentős mértékben befolyásolja az elektródhoz való tapadási képessége és a biofilm képzési tulajdonsága. Ezért a *Shewanella xiamenensis* típus törzs esetében vizsgáltam a kultúra tapadási tulajdonságát anaerob körülmények között vas(III)-ionok jelenlétében és hiányában, valamint a MÜC rendszerekben különböző elektród felületeken.

A törzs tapadási tulajdonságának megállapítására a különböző felületekre (polisztirol, rozsdamentes acél, alumínium és grafit lap) megtapadt sejtek mennyiségét határoztam meg. A kapott eredményeket a 9. táblázat mutatja.

9. táblázat: Megtapadt *Shewanella xiamenensis* sejtek száma különböző felületeken és környezeti viszonyok mellett

Hordozó	Környezet	Megtapadt sejtmenyiség, TKE/cm ²
Polisztirol	Vas(III)+anaerob	2,59±0,2·10 ⁵
Polisztirol	Anaerob	4,75±0,5·10 ⁶
Acél	Anaerob	4,19±0,4·10 ⁵
Alumínium	Anaerob	8,34±0,7·10 ⁵
Grafit	Anaerob	8,01±0,6·10 ⁶
Acél	MÜC	2,35±0,1·10 ⁵
Alumínium	MÜC	1,10±0,1·10 ⁷
Grafit	MÜC	9,09±0,8·10 ⁷

A 9. táblázatban szereplő adatok minden esetben 48 órás inkubálást követően kapott eredmények. Anaerob tenyésztésnél a rozsdamentes acél és az alumínium felületeken csak 10⁵ TKE/cm² sejtmenyiség tapadt meg, míg az polisztirol felületen és a grafit lapon egy nagyságrenddel nagyobb, 10⁶ TKE/cm² sejtmenyiséget detektáltam. Ez a jelenség feltételezhetően a felületek eltérő érdességéből származik. A fém felületek érdessége a műanyagokhoz és a grafit érdességéhez viszonyítva jelentősen kisebb, azonban a kiváló megmunkálhatóságuk miatt felületkezeléssel (polírozással, maratással, stb.) a felületek érdessége megnövelhető. A grafit lemez struktúráját tekintve préselt szálakból épül fel, melynek köszönhetően könnyebb a mikroba sejt-elektrod kontaktus kialakulása.

Anaerob környezetben a vas(III)-ionok indukciós hatását is vizsgáltam, amelynek során a tápközeghez 5 g/l koncentrációban vas(III)-citrátot adtam (csak polisztirol felületnél). A Fe³⁺-ionok jelenlétében a megtapadt sejtek száma szignifikánsan kisebb volt, mint vas(III)-ionok

hiányában (9. táblázat). Ez a megfigyelés összhangban van azzal a feltételezéssel, amit FENG és munkatársai (2013) állapítottak meg, miszerint a bio-elektromos áramképzés hasonló mikrobiális anyagcsere útvonalon megy végbe, mint az extracelluláris Fe^{3+} -redukció. Ha a terminális elektron-akceptorok oldott állapotban jelen vannak a tápközegben, akkor a mikroba nem alakít ki közvetlen kapcsolatot az elektróddal, mivel a vas(III)-ionok potenciális elektron-akceptorként funkcionálnak. Ez magyarázhatja, hogy a tápközegben oldott vas(III)-ionok csökkentik a megtapadt sejtek mennyiségét.

A vizsgálataim során mértem a különböző mikrobiális üzemanyagcella anódfelületeken megtapadt sejtek számát, hogy feltárjam az üzemanyagcellában létrejövő potenciál különbség hatását. A rozsdamentes acél anódot tartalmazó MÜC és az anaerob tenyészetek között nem mutatható ki szignifikáns különbség a megtapadt sejtek számában. Az alumínium és a grafit lemezeknél azonban jelentős különbségeket tapasztaltam (9. táblázat). A MÜC redox-potenciálja a grafit esetében egy, míg az alumínium esetében két nagyságrenddel növelte az anód felületére tapadt sejtek számát, az anaerob mintákhoz képest.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a *S. xiamenensis* képes az elektródfelületeken megtapadni. A mikrobiális üzemanyagcellában fellépő redox-potenciál különbség jelentősen megnövelte a megtapadt sejtek mennyiségét.

6.3 Elektródok fejlesztése a MÜC teljesítményének növelésére

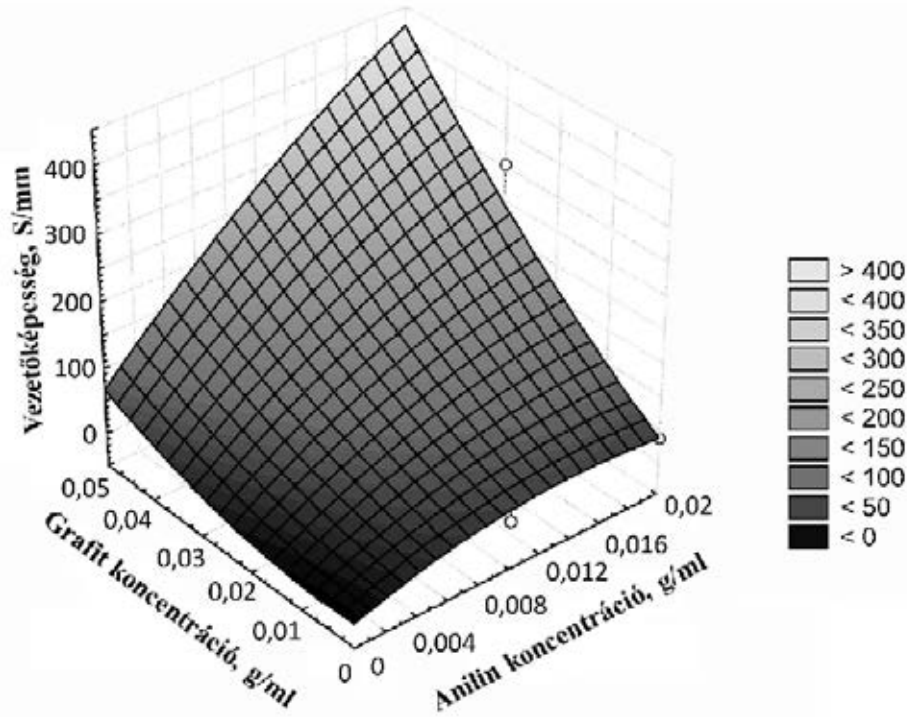
6.3.1 Elektromosan vezetőképes gél-anód létrehozása

A mikrobiális üzemanyagcella teljesítményének növelésében, a konstrukcióból adódóan, meghatározó tényező az anód kialakítása, így a hatékonyság növeléséhez elengedhetetlen az anód konstrukció fejlesztése. Számos faktor befolyásolja az anód teljesítményét például, az alkalmazott mikroba, az elektromos vezetőfelület, stb. A különböző, elektromosan vezetőképes gélek több szempontból is rendkívüli tulajdonságokkal rendelkeznek. A gélek nagy fajlagos felületűek, és a térbeli hálózatuk miatt a cella teljes térfogata kihasználható. A gél-mátrix védettséget biztosít a befertőződés ellen, valamint lehetőséget nyújt a rendszer fél-folytonos illetve folytonossá tételére. A megfelelő vezetőképes gélek létrehozásával új hatékony elektród kialakításhoz juthatunk, ami jelentősen elősegítheti a technológia elterjedését.

6.3.1.1 A gél-elektrodok vezetőképességének növelése

A vezetőképes gél-elektrod kialakításához polianilint és grafitport adtam különböző koncentrációkban az alginát gélekhez. Az elektromos vezetőképességi mérések alapján azt

tapasztaltam, hogy az anilin és a grafitpor hozzáadása jelentősen megnövelte a gélek vezetőképességét. A PANI és grafitpor mennyiségének a vezetőképességre gyakorolt hatását a 32. ábra szemlélteti.



32. ábra: A gélek elektromos vezetőképessége az anilin és a grafitpor koncentráció függvényében

0,01 g/ml koncentrációjú anilin hozzáadása már hatszorosára növelte a gél-elektrod vezetőképességét (3,4 S/mm-ről 21,5 S/mm-re), míg 0,02 g/ml PANI hatására 10-szeresre növekedett a módosított gél vezetőképessége (35,5 S/mm-re).

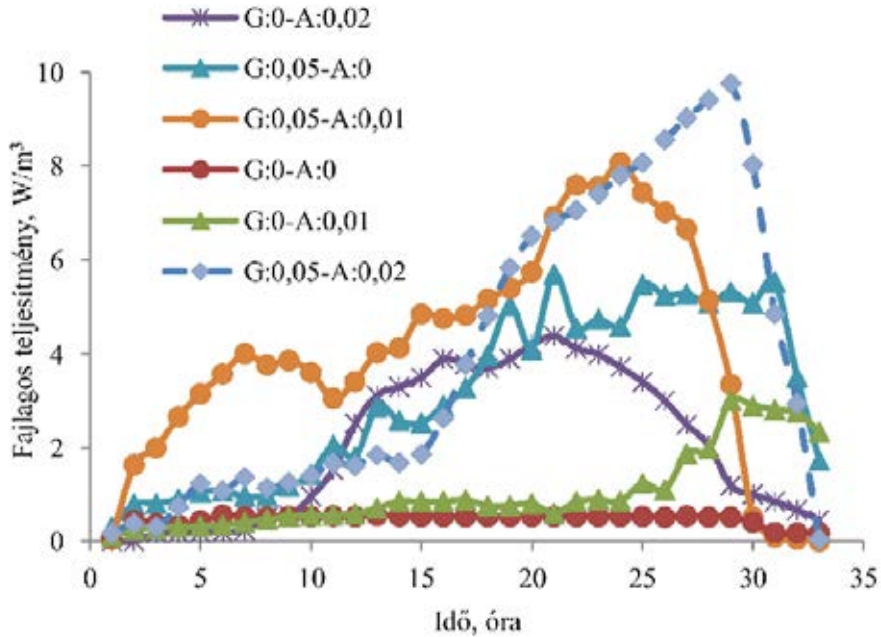
A grafitpor adagolás szintén jelentősen csökkentette az elektródok elektromos ellenállását. 0,03 g/ml grafitpor mennyiség 27,8 S/mm-re, míg 0,05 g/ml grafitpor 10-szeresére (3,4 S/mm-ről 33,3 S/mm-re) növelte a gélek vezetőképességét. Érdeemes megjegyezni, hogy a polianilin és a grafitpor egyidejű alkalmazása az előzőekhez képest is szignifikánsan megnövelte az elektród vezetőképességét. 0,01 g/ml PANI és 0,03 g/ml grafitpor együttesen 22-szeres vezetőképesség növekedést okozott, míg további koncentráció növelés, 0,05 g/ml grafitpor és 0,02 g/ml PANI koncentráció 105-szörös elektromos vezetőképesség változást (3,4 S/mm-ről 366 S/mm-re) eredményezett. Azt tapasztaltam, hogy további vezetőképességet növelő anyag hozzáadása a gél szerkezet stabilitásának és flexibilitásának jelentős csökkenését okozta.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy polianilin és grafitpor használatával jelentősen csökkenthető a gélek elektromos ellenállása. A vizsgálati eredményeim összhangban

vannak a szakirodalomban fellelhető kutatásokkal. RAMANA és munkatársai (2011) grafit nanocsővek és szén-nanolemez/polianilin kompozitok elektromos vezetőképességét vizsgálták és arra a következtetésre jutottak, hogy a szén nano-részecskék a polianilinnel kompozitot hoznak létre. A komponensek szinergens hatásúak egymásra nézve, így a létrehozott kompozit ellenállása kisebb, mint az egyes összetevőké külön-külön. A gél-elektrodok esetében alginát gélhálón alakítottam ki a vezetőképes PANI-grafit réteget (14. ábra). Elektromos vezetőképesség tekintetében mindkét anyag megfelelő, azonban a vezetőképesség természete eltérő, ami hozzájárulhatott az együttes alkalmazásnál tapasztalt kiemelkedő hatáshoz. A grafit szemcsén belüli szén lapocskák feltételezhetően összekötő hídként szerepelnek a PANI-nal bevont alginát háló között, így növelve a kompozit elektromos vezetőképességét.

6.3.1.2 Különböző összetételű gél-elektrodokkal létrehozott, szakaszos üzemű MÜC-rendszerek vizsgálata

A vezetőképesség-mérést követően a polianilinnal és grafitporral módosított gél-elektrodok további elektrokémiai tulajdonságait vizsgáltam szakaszos üzemű mikrobiális üzemanyagcella rendszerben. A különböző PANI és grafitpor-tartalmú hidrogél kompozíciókba elektrogén, *Shewanella algae* DSMZ 9167 törzs baktérium kultúrát zártam és a MÜC-rendszerben való alkalmazhatóságot az elektromos feszültség képzés révén vizsgáltam. Különböző anilin (0; 0,01; 0,02 g/ml) és grafitpor koncentrációkat (0; 0,05 g/ml) vizsgáltam. A kapott eredményeket a 33. ábra mutatja.



33. ábra: A különböző összetételű gél-elektrodokat tartalmazó MŰC-rendszerek fajlagos teljesítménye szakaszos üzemben (G: grafit koncentráció, g/ml; A: anilin koncentráció, g/ml)

A vezetőképesség növelő adalékok hozzáadása, az elektromos ellenálláshoz hasonlóan, jelentősen befolyásolták a mikrobiális üzemanyagcellában keletkezett elektromos áramot. Az elektromos feszültség 1,5-szörösre nőtt a 0,01 g/ml és több mint kétszeresére a 0,02 g/ml koncentrációjú anilin hozzáadás hatására, ami az üzemanyagcella fajlagos teljesítményének két- és háromszoros növekedését jelenti (1,45 W/m³-ről 3,02 és 4,39 W/m³-re változott). 0,05 g/ml koncentrációban grafitpor hozzáadása a cella elektromos feszültségét kétszeresére növelte (0,17 V-ről 0,34 V-re) és négyszeresére a fajlagos teljesítményt (1,45 W/m³-ről 5,77 W/m³-re).

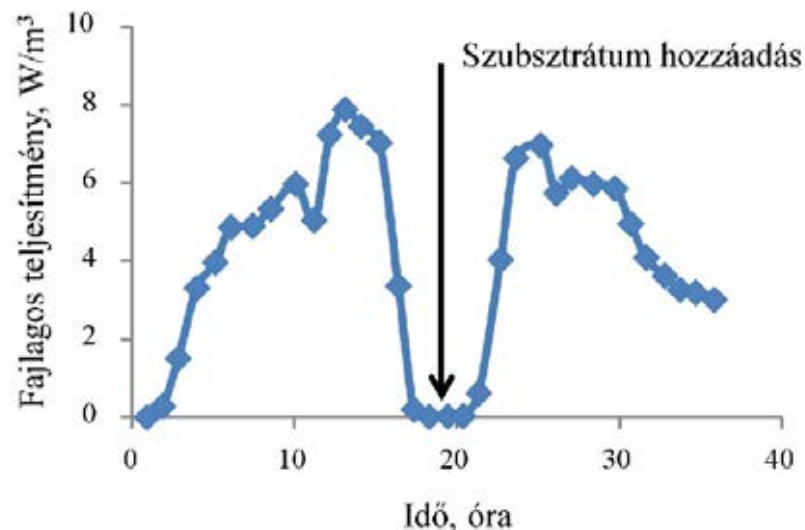
Továbbá a polianilin és grafitpor együttes alkalmazása nagyobb elektromos teljesítményt eredményezett a mikrobiális üzemanyagcellákban is. Míg a 0,01 g/ml polianilin és 0,05 g/ml grafitpor koncentráció 7,81 W/m³-re növelte az üzemanyagcella fajlagos teljesítményét, addig a 0,02 g/ml PANI és 0,05 g/ml grafitpor hozzáadás háromszorosára növelte a MŰC elektromos feszültségét (0,17 V-ről 0,44 V-re), és több mint hétszeresére a fajlagos teljesítményt (1,45 W/m³-ről 9,86 W/m³-ra).

A polianilin és grafitpor hozzáadása jelentősen csökkentette a gél-anód kompozíciók elektromos ellenállását, ami megjelent a mikrobiális üzemanyagcellák elektromos tulajdonságaiban is. Ennek alapján feltételezhető, hogy a megnövelt elektromos áram kihozatal a vezetőképes gél-elektrodok nagy fajlagos felületének köszönhető, ami elősegíti a mikroba-elektrod interakciókat, valamint elősegíti az elektronok elvezetését. LAI és munkatársai (2011)

közölték, hogy a grafit-alapú mikrobiális üzemanyagcella anódjának polianilinnel való kezelése jelentősen megnöveli a cella fajlagos elektromos teljesítményét. Hasonlóképpen CHEN és munkatársai (2014) bizonyították, hogy az anódtérbe juttatott grafitpor képes megnövelni a bakteriális extracelluláris elektrontranszfer hatékonyságát. Megállapítható, hogy a polianilinnel és grafitporral történő kezelés hatékony extracelluláris elektron-közvetítést tesz lehetővé, ami a mikrobiális üzemanyagcella teljesítményének növekedésében mutatkozik meg.

6.3.1.3 Gél-elektrodokkal létrehozott fél-folytonos üzemű MÜC rendszer vizsgálata

A polianilinnel és grafitporral módosított alginát-gyöngy anódokat fél-folytonosan működtetett MÜC rendszerbe helyeztem. A szakaszos üzemű MÜC beállítások eredményei alapján kiválasztottam a legnagyobb teljesítményt nyújtó gél kompozíciót és a továbbiakban ezt az összeállítást használtam. A gél 0,02 g/ml koncentrációban tartalmazott anilint és 0,05 g/ml koncentrációban grafitport. A mérés hasonlóan indult, mint a szakaszos üzemű kísérletekben, azonban amikor az üzemanyagcella feszültség-termelése csaknem 0 V-ra csökkent, az anódtartalmát eltávolítottam és új szubsztrátum oldattal tápláltam. A 34. ábra mutatja az üzemanyagcella elektromos áramtermelését fél-folytonos üzemeltetéssel.



34. ábra: A gél-elektrodot tartalmazó MÜC-rendszer fajlagos teljesítménye fél-folytonos működtetésben

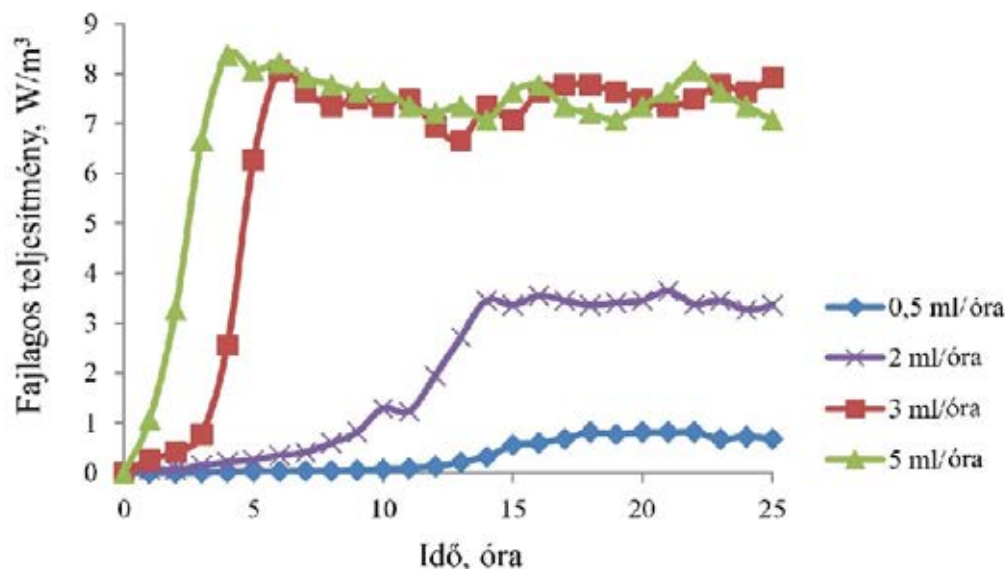
A beoltást követő időintervallumban az áramtermelés folyamatosan növekedett. Ez az elektromos karakterisztika hasonló, mint amit a szakaszosan működtetett MÜC beállításoknál is tapasztaltunk. Miután a teljesítmény elérte a maximumát ($7,88 \text{ W/m}^3$) az áramtermelés gyorsan

csökkenni kezdett. Ekkor a szubsztrátumokban kimerült anolitot eltávolítottam és új tápoldatot injektáltam az anódtérbe. A tápanyag hozzáadás eredményeként a mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramtermelése ismét növekedni kezdett és újra maximum közeli értékeket mutatott ($6,96 \text{ W/m}^3$). Az újratöltést tíz alkalommal megismételtem minden ciklus során a fajlagos teljesítmény ismét maximum közeli értéket ért el.

Az eredményekkel összhangban megállapítható, hogy a módosított gél-elektrodok alkalmazhatók fél-folytonos üzemű MÜC rendszerekben. A MÜC elektromos áramképzése megfelelő mikroba visszatartásról tanúskodik, mivel az áramerősség az újratöltést követően ismét elérte a maximumot.

6.3.1.4 Gél-elektróddal létrehozott folytonos üzemű MÜC rendszer vizsgálata

A folytonos üzemű MÜC rendszerben $0,02 \text{ g/ml}$ anilin és $0,05 \text{ g/ml}$ grafitpor koncentrációval rendelkező géleket használtam. A mikrobiális üzemanyagcella anód térfogata 12 ml volt, ezért a szubsztrátum oldat betáplálási térfogatáramát $0,5 \text{ ml/óra}$ és 5 ml/óra tartományban változtattam. A 35. ábra szemlélteti az üzemanyagcella elektromos áramképzését különböző betáplálási térfogatáramok függvényében.



35. ábra: Különböző betáplálási térfogatáramok hatása a gél-elektrodot tartalmazó MÜC teljesítményére

Az eredmények alapján megállapítható, hogy elektromos áramképzés minden térfogatáram esetében tapasztalható. A betáplálási térfogatáram növelésével a cella elektromos áram kihozatala is növekedett. A betáplálás 0,5 ml/órától 2 ml/óra történő emelése 2,5-szörösére növelte az üzemanyagcella fajlagos teljesítményét (0,81-ről 3,55 W/m³-re). 3 ml/órás szubsztrátum betáplálás az elektromos áram képzés maximumát (7,92 W/m³) eredményezte és ez az érték stabil maradt a folyamat végéig (három napig). A betáplálási térfogatáram további növelése már nem növelte jelentősen az elektromos áramtermelést azonban a maximális teljesítményét hamarabb elérte a rendszer. Hasonlóan a fél-folytonos vizsgálatok eredményéhez a gélek mikroba-visszatartása ebben az esetben is megfelelő volt, mivel a betáplálási térfogatáram növelése nem okozta a baktérium sejtek kimosódását. Ez megerősíti a gél-elektrodok mikroba visszatartó tulajdonságát.

Ha a gél-elektrodos folytonos üzemű mikrobiális üzemanyagcella teljesítményét összehasonlítjuk a leginkább elterjedt folytonosan kevertetett tankreaktor típusú (CSTR) folytonos MÜC-rendszerek teljesítményével (AKMAN *et al.*, 2013; YOU *et al.*, 2006), megállapíthatjuk, hogy gél elektrodok segítségével nagyobb fajlagos teljesítmény érhető el. YOU és munkatársai (2006) egyik tanulmányukban 2,06 W/m³ fajlagos teljesítményt értek el kétkamrás, és 6,82 W/m³-t egykamrás MÜC-rendszerben. LAI és munkatársai (2011) egyik publikációjukban pedig 5,16 W/m³-es fajlagos teljesítményről számolnak be polianilinnel módosított grafit elektrodokat alkalmazva, azonban ebben a kutatásban az üzemanyagcellák szakaszos üzemben működtek. Összegezve megállapítható, hogy a vezetőképes gél-anódok megfelelően alkalmazhatók folytonos üzemű mikrobiális üzemanyagcella rendszerekben is. A betáplálási térfogatáram növelésével emelhető az üzemanyagcella elektromos teljesítménye az elektro-aktív baktérium sejtek kimosódása nélkül.

6.3.2 Katód fejlesztés - MÜC rendszer nikkell katalizátorral a katód oldalon

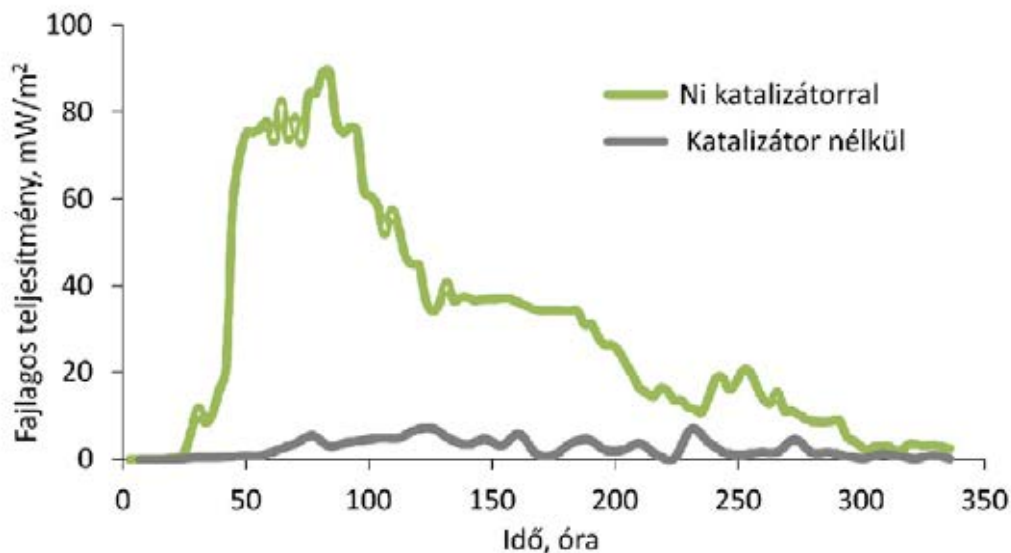
A mikrobiális üzemanyagcella teljesítményét szintén nagymértékben befolyásolja a katódtér kialakítása, mivel a katód felületén lejátszódó többfázisú reakció is felelős az üzemanyagcella két elektródja közti potenciál különbség kialakulásáért.

Katód fejlesztési kísérleteim során nikkelt használtam fel, mint katalizátort, a katód felületeken. A nikkell réteget az elektród felületére galvanizációs technikával vittem fel. Kísérleteimben egykamrás mikrobiális üzemanyagcellát alkalmaztam grafit anóddal és rézhálót használtam katódként, valamint *Geobacter sulfurreducens*-et elektro-aktív biokatalizátorként. A

kísérletekben a katalizátor nélkül és nikkell katalizátorral is mértem az üzemanyagcella elektromos áramtermelését.

Az eredmények alapján (36. ábra) egyértelműen megállapítható, hogy a nikkell katalizátor jelentősen növelte az üzemanyagcella elektromos teljesítményét. A fém-nikkell katód katalizátorként való alkalmazása 4-szeresére növelte a kinyerhető maximális feszültséget a katalizátor nélkül működtetett beállítással szemben. A nikkellel bevont katód esetén a legnagyobb feszültség 330 mV volt, míg a nikkell nélküli réz csupán 94 mV potenciál különbséget hozott létre.

A katódfelületére vonatkoztatott fajlagos teljesítmény értékek 12-szeres növekedést mutattak a nikkell bevonat hatására. Az eredmények alapján belátható, hogy a nikkell katalizátor alkalmazásával növelhető a MÜC-rendszer hatékonysága. Ez lehetőséget nyújt egy olcsó és hatékony katód koncepció kialakítására, ami elengedhetetlen feltétel a mikrobiális üzemanyagcellák léptéknöveléséhez.



36. ábra: Nikkell katalizátor hatása a MÜC elektromos teljesítményére

A nikkell katalizátort hatékonyságának kimutatására a szakirodalomban fellelhető más katód katalizátor konstrukciók eredményeivel összehasonlítottam. Az összehasonlítást nehezíti, hogy a kutatók nem egységes üzemanyagcella rendszereket és beállításokat alkalmaztak, így a teljesítmény értékek nagyban különbözhetnek más üzemeltetési feltételek függvényében (pl. mikrobák, hőmérséklet, szubsztrátum, stb.).

Általánosságban elmondható, hogy a nemesfémek rendelkeznek legjobb katalitikus tulajdonságokkal, így az ezekkel a fémekkel végzett kísérletek fajlagos teljesítmény értékei legalább egy nagyságrenddel nagyobbak, mint az általam mért értékek (10. táblázat). A nagyobb teljesítményt mutató platina katalizátoros konstrukció (TRINH *et al.*, 2009) üresjárás feszültsége

kétszerese a nikkeles katódot használó MÜC-rendszernek, míg fajlagos teljesítménye több, mint hétszerese.

10. táblázat: A MÜC teljesítményének összehasonlítása korábbi tanulmányok eredményeivel

Katalizátor	Anód	Katód	U_{oc} (mV)	p (mW/m ²)	Hivatkozás
Pt	szénkendő	Ni/W	510	680	(LIU <i>et al.</i> , 2012a)
Ni/Mo/C	grafit	grafit	690	467	(ZENG <i>et al.</i> , 2012)
Pt	szén-papír	szén-papír	700	865	(TRINH <i>et al.</i> , 2009)
Pd	grafit	Ti/TiO ₂	500	200	(HOSSEINI és AHADZADEH, 2012)
Ni	grafit	Réz háló	450	90	Saját adat

U_{oc} : a MÜC üresjárási feszültsége; p : a MÜC fajlagos teljesítménye

Ha azonban az anyagköltségek szempontjából is megvizsgáljuk az eredményeket, akkor a nikkel katalizátor sokkal kedvezőbb eredményeket mutat, mint a nemesfémek (11. táblázat).

11. táblázat: Katalizátorok költségeinek és teljesítményének összehasonlítása

Katalizátor	Egység ktg EUR/g	P mW/m ²	Pt-ra vonatkoztatott ktg (EUR/g)/(EUR/g) _{Pt}	Ktg hatékonyság mW/m ² /(EUR/g)	Hivatkozás
Pt	175	800	1	4,571	TRINH <i>et al.</i> (2009)
Pd	126	200	0,720	1,587	HOSSEINI és AHADZADEH (2012)
Ni	0,87	90	0,005	103,162	Saját adat

P : a MÜC fajlagos teljesítménye

A kiválasztott katalizátor fémek árát a platina árára vonatkoztatva megállapítható, hogy a platina közel 500-szor drágább a nikkelnél. A korábban említett hivatkozások teljesítmény értékei alapján látható, hogy a platinát használva közel 7-szeres elektromos teljesítmény várható a nikkelhez összehasonlítva. Ha a teljesítményértékeket az anyagköltségekre vonatkoztatjuk, feltűnik, hogy a nikkel katalizátor költséghatékonysága 22-szerese a platinát használó rendszerekének és 65-szöröse a palládium tartalmú katalizátort használó MÜC-nek. Ennek alapján megállapítható, hogy a nikkel használata alkalmas lehet katód kialakításához, és az optimalással még növelhető a teljesítménye, így ezen eredmények hozzájárulhatnak a MÜC-rendszerek léptéknöveléséhez és elterjedéséhez.

6.4 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Új, vas-redukción alapuló mikroba-szelektáló fotometriás módszert dolgoztam ki, amely segítségével az adott mikroorganizmus elektromos áramtermelése és elektronátadása becsülhető. A módszer gyors, robusztus és nagy kapacitású, alkalmazásával a leendő MÜC-ben keletkező áramsűrűség a következő modellel leírható: $\text{áramsűrűség} = 46,77 \Delta A_{460\text{nm}} + 4,17$, ha 10^6 TKE/ml beoltási sejtkoncentrációt alkalmazunk (SZÖLLŐSI *et al.*, 2015b).
2. Feltártam a *Geobacter toluenoxydans* DSMZ 19350 törzs szaporodás-kinetikai és elektromos áramtermelése közti összefüggéseket nátrium-acetát szubsztrátum esetében. Megállapítottam, hogy a szaporodási-kinetika a LUONG modellel leírható. Szubsztrátum inhibíció figyelhető meg 2 g/l-nél nagyobb Na-acetát koncentrációk esetében, mind a mikroba szaporodásában, mind a Fe^{3+} -redukcióban. A termékképzési (vas-redukció) kinetika leírására a HALDENE modell bizonyult a legmegfelelőbbnek. A szaporodás és a vas-redukció összefüggésének leírására a LUEDEKING-PIRET módszer bizonyult alkalmasnak, ami szerint mind a szaporodási sebesség, mind a jelenlévő sejtömeg jelentősen befolyásolja a vas-redukciót és ezáltal az elektromos áramtermelést (SZÖLLŐSI *et al.*, 2015a).
3. Meghatároztam a *Shewanella xiamenensis* DSMZ 22215 törzs szaporodási és vas(III)-redukciós képességének összefüggéseit, a szubsztrátum hasznosítását, a tapadási képességeit, valamint az extracelluláris, vezetőképes fehérje és riboflavin képzését. Vas(III)-citrát elektronakceptort alkalmazva a maltóz és maltodextrin szénhidrátok esetén szignifikánsan nagyobb mértékű vas(III)-redukció figyelhető meg, mint glükóz, galaktóz és laktóz szubsztrátumokon. Bebizonyítottam, hogy a mikroba képes megtapadni különböző felületeken pl. a polisztirol, alumínium, acél vagy a grafit felületeken. A legnagyobb sejtömeg a szálal szerkezetű grafiton volt detektálható. A tápközeg vas(III)-ionokkal való kiegészítése csökkentette a mikroba tapadási képességét polisztirol felületen. Megállapítottam, hogy anaerob minták esetében a mikroba nagyobb mennyiségű extracelluláris fehérjét és riboflavint termelt, mint aerob körülmények között. Továbbá, az exogén riboflavin adagolása növeli a mikroba elektromos áramképzését.
4. Új típusú elektromosan vezetőképes gél-elektrodot hoztam létre, ahol polianilin-alginát-titándioxid-grafit gélbe rögzítettem az alkalmazott mikroba sejteket. Az új anóddal olyan MÜC konstrukciót hoztam létre, amely képes megnövelt hatékonysággal különböző módon üzemelni (szakaszos, fél-folytonos és folytonos) (Szöllősi *et al.*: Formation of novel hydrogel

bio-anode by immobilization of biocatalysts in alginate/polyaniline/titanium-dioxide/graphite composites and its electrical performance in microbial fuel cell, Journal of Power Sources, közlés alatt, referencia szám: POWER-D-15-03121).

5. Sikeresen hoztam létre nemesfém nélküli, nikkellel galvanizált rézelektrodát, amely lég-katódként funkcionálhat. Segítségével egykamrás, működő MÜC konstrukciók alakítható ki, amelyek bár kisebb teljesítményűek, de kisebb költségekkel megvalósíthatók.

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A mikrobiális üzemanyagcella technológia egyik meghatározó tényezője a benne alkalmazott mikrobakultúra, amely felelős a tápanyagokban kötött kémiai energia közvetlen elektromos energiává átalakításáért. Az utóbbi évtizedben az intenzív kutatás ellenére még mindig kevés ismeret áll rendelkezésre mikrobák/mikroba közösségek elektromos áramtermelő tulajdonságairól, valamint azok elektromos áramtermelés szempontú szelekciójáról. Az általam létrehozott gyors módszer a mikrobák vas(III)-redukcióján alapul és nem igényel MÜC infrastruktúrát a szelekcióhoz. Az eljárás alkalmas egyidejűleg nagyszámú mikroba faj/törzs vizsgálatára, így biztosítva lehetőséget a kutatóknak a MÜC technológiában alkalmazható mikrobák körének bővítésére, valamint a kultúrák elektromos áramtermelésének becslésére.

A szaporodási- vas(III)-redukciós-, valamint a szubsztrátum hasznosítási képesség, a tapadási- és biofilmképzési tulajdonságok, az extracelluláris vezetőképességű fehérjék és a redox mediátorok termelésének vizsgálata során szerzett ismeretek megfelelően hasznosíthatók a *G. toluenoxidans* és *S. xiamenensis* fajok különböző célú (szennyvíztisztítási vagy energiatermelési) és kialakítású MÜC-rendszerekben való alkalmazásánál. Ezen információk nélkülözhetetlenek az esetleges további törzsfelvezetésekhez, amelyek során hatékony elektromos áramtermelő MÜC konstrukciók hozhatók létre. A *S. xiamenensis* DSMZ 22215 faj jól hasznosítja a maltózt vagy maltodextrint tartalmazó tápközegeket. Ez a képesség alkalmassá teszi ezt a törzset olyan rendszerben való alkalmazásra, mint nagy mennyiségű keményítőt tartalmazó szennyvizek (pl. a söripari, keményítőipari vagy akár papíripari szennyvizek) ártalmatlanítására.

Az elektromosan vezetőképességű gél-anód konstrukció az eddig általánosan alkalmazott lap elektródokhoz képest jobb helykihasználást biztosíthat, mivel nagy fajlagos felületű, megnövelheti az üzemanyagcella teljesítményét. A gél-mátrix megfelelő védelmet nyújthat a befertőződéssel szemben is, így létrehozhatók nem steril körülmények között is monokultúras mikrobiális üzemanyagcella rendszerek. A gél-anódok megfelelően teljesítettek a különböző üzemeltetési módokban, így megfelelő alapot szolgálhatnak a léptéknöveléséhez, amely akár ipari alkalmazáshoz is vezethet. A nikkellel galvanizált katód lehetőséget nyújt olyan egykamrás MÜC kialakítás létrehozásához, amely nem igényel nemesfém katalizátort, miközben megfelelő teljesítményt biztosít. Ez fontos tényező a gazdaságos és olcsó MÜC rendszerek megalkotásához. Összegezve, PhD kutatásom eredményei alapkutatás jellegűek, de hozzájárulnak a MÜC technológia elterjedéséhez, így bővítve az értéknövelő szennyvíztisztítási lehetőségeket, valamint további távlatot nyithat más tudományágak számára, mint a diagnosztika, energetika vagy akár az űrkutatás számára.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikrobiális üzemanyagcella technológia egy gyorsan fejlődő és rendkívül ígéretes alternatív energiaforrás és szennyvízkezelési lehetőség. Meg kell említeni, hogy a mikrobák elektromos áram termelőképességének kiaknázása nem újkeletű gondolat. Az első redox mediátorral működő mikrobiális üzemanyagcella az 1910-es években látott napvilágot és a 60-as évek elején már mediátor nélküli változatokat is létrehozottak.

Az elterjedését nagymértékben gátolja a léptéknövelés nehézsége. Továbbá a megoldandó problémák közé tartozik az anódtér teljes térfogatának kihasználása, a protonok intenzívebb anódtérből katódtérbe juttatása, a mikrobák és az elektród közti elektromos kapcsolat javítása, az elektromos feszültség növelése, a katódtér levegőztetésének elhagyása, stb. Szintén problémát jelent az alkalmazás szempontjából, hogy a mikrobák anyagcsere tulajdonságai még törzsenként is nagymértékben különbözhetnek, ami nagy hatással lehet az üzemanyagcella teljesítményére. A megfelelő termelő törzs(ek) kiválasztása és fejlesztése nélkülözhetetlen a sikeres mikrobiális üzemanyagcella technológia kidolgozásában. Továbbá, a különböző mikroba fajok elektrogén tulajdonságainak megismerése, valamint új típusú elektród kialakítások elengedhetetlenül fontosak egy stabil és nagy hatékonyságú MÜC-rendszer létrehozásához. PhD kutatásomban ebből a szempontból közelítettem meg a MÜC teljesítmény-növelését.

Megvizsgáltam különböző mikroorganizmusok vas(III)-redukciós képességét metilén-kék mediátor jelenlétében és hiányában. Ez a képesség abban rejlik, hogy a mikrobák anaerob körülmények között az anyagcseréjükben képzett redukált koenzimek regenerálása során képződő elektronokat a sejtfal külső membrán elektronláncán keresztül a vas(III)-ionoknak adják át. Megfigyelhető, hogy az extracelluláris elektronok termelése szorosan kapcsolódik a szaporodáshoz (elsődleges anyagcsere termék), ugyanakkor a beoltási sejtkoncentráció is jelentősen befolyásolja a mikroba Fe^{3+} -redukcióját. Megállapítottam, hogy a *Lactobacillus plantarum* kivételével minden vizsgált mikroorganizmus jelentős Fe^{3+} -redukciót mutatott még metilén-kék mediátor hiányában is, ami feltételezi a mikrobák extracelluláris elektron termelését és a tápközegbe történő szekrécióját. *Lactobacillus plantarum* faj esetén csak metilén-kék jelenlétében mutattam ki a Fe^{3+} -ionok redukcióját, amely azt jelenti, hogy ez a faj nem képes közvetlenül, hanem csak mediátoron keresztül átadni elektronjait sejten kívüli akceptoroknak.

Gyors szelektálási módszert dolgoztam ki, amelynek segítségével a különböző mikroba törzsek MÜC rendszerekben való alkalmazhatósága becsülhető. A módszer a mikrobák vas(III)-redukciós képességén alapul. Megállapítottam, hogy szoros lineáris korreláció mutatható ki (**Modell 1**) a mikrobák Fe^{3+} -redukciója, a beoltási sejtkoncentráció és a termelt elektromos áram között.

$$\text{Modell 1: } z = 41,771 \cdot x + 0,726 \cdot y + 1,513$$

ahol: z: fajlagos elektromos áramerősség (mA/m²), x: 460 nm-en mért abszorbancia változása, y: beoltási sejtszám logaritmus (TKE/ml).

Továbbá megállapítottam, hogy ha a kezdeti sejtszám nagyobb, mint 10⁶ TKE/ml, akkor szorosabb összefüggés tapasztalható a fajlagos elektromos áramtermelés és a mikrobás Fe³⁺-redukció között. Ebben az esetben a modelltől elhagyható a kezdeti sejtszám, így a korrigált modell az alábbi egyenlettel (**Modell 2**) írható le.

$$\text{Modell 2: } z = 46,04 x + 4,17$$

ahol: z: fajlagos elektromos áramerősség (mA/m²), x: 460 nm-en mért abszorbancia változása.

A modellek validálásához különböző *Geobacter* (*G. sulfurreducens*, *G. toluenoydans*, *G. metallireducens*) és *Shewanella* (*S. algae*, *S. japonica*, *S. woody*) fajokat alkalmaztam. A vas(III)-redukciós tesztben mért abszorbancia változásokat beillesztettem a létrehozott modellekbe és összehasonlítottam a mikrobák MŰC-ben létrehozott fajlagos elektromos áramtermelésével és elektromos kapacitásokkal. Megállapítottam, hogy az általam kidolgozott modellek alkalmazásával a mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramerőssége megfelelően prediktálható.

Megállapítottam két kevésbé ismert mikrobafaj elektromos áramtermelési tulajdonságát. A *Geobacter toluenoydans* szaporodásvizsgálata során Na-acetát szubsztrátumot alkalmazva szubsztrátum-inhibíció lépett fel 2 g/l-t meghaladó koncentrációk esetében. Ezt a szaporodási kinetikát a LUONG modellel tudtam a leginkább leírni, amelynek kinetikai konstansai a következők: $\mu_{\max} = 0,033$ 1/óra; $K_S = 0,205$ g/l; $n = 1,1$; $S_{\max} = 3,10$ g/l. A modell szerint a mikroba nem szaporodik a 3,1 g/l-es koncentrációnál nagyobb nátrium-acetátot tartalmazó tápközegben.

A mikroba Fe³⁺-redukciós tulajdonságait tekintve, szintén szubsztrátum-inhibíciót figyelhettem meg 2 g/l-nél nagyobb Na-acetát koncentrációk esetében. Ebben az esetben HALDENE modellt használva sikerült a legkisebb hibával leírni a vas-redukciós kinetikát: $\mu_{\max}^P = 0,123$ mg Fe³⁺/óra, $K_S = 0,184$ g/l, $K_{SI} = 1,104$ g/l. Megállapítottam, hogy a 1,104 g/l koncentrációnál nagyobb mennyiségű Na-acetát szubsztrátum már gátlón hat a *G. toluenoydans* mikroba vas(III)-redukciójára

A szaporodási és vas-redukció összefüggését LUEDEKING-PIRET módszerrel vizsgáltam. Az elemzés eredménye szerint mind a szaporodási sebesség, mind a jelenlévő sejtömeg jelentősen befolyásolta a *G. toluenoydans* vas-redukcióját és ezáltal az elektromos áramtermelést.

Megvizsgáltam a *Shewanella xiamenensis* DSMZ 22215 törzs szubsztrátum hasznosítását anaerob körülmények között vas(III)-ionok jelenlétében. A szaporodás-kinetikai kísérletek során glükózt tartalmazó tápközegekben gyorsabban szaporodtak a sejtek, mint maltózon, azonban a vas(III)-redukciós tulajdonságot vizsgálva azt tapasztaltam, hogy intenzívebb vas(II)-ionképzés

detektálható maltóz szubsztrátumon, mint glükózon. Továbbá megállapítottam, hogy az *S. xiamenensis* szaporodása Monod modellel leírható a következő konstansokkal:

glükóz szubsztrátum: $\mu_{\max} = 0,121$ 1/óra, $K_S = 0,893$ g/l

maltóz szubsztrátum: $\mu_{\max} = 0,096$ 1/óra, $K_S = 1,001$ g/l

Maltóz és maltodextrin szubsztrátumoknál szignifikánsan nagyobb mértékű vas(III)-redukció volt kimutatható, mint glükóz, galaktóz és laktóz esetében. Lineweaver-Burk linearizációs módszerrel meghatároztam a *Shewanella xiamenensis* vas(III)-redukciós kinetikai paramétereit glükóz és maltóz szubsztrátumon. Maltóz esetén a maximális redukciós sebesség $73,6$ mgFe²⁺/óra, a K_S pedig $0,196$ g/l volt, míg glükóznál a μ_{\max}^P $62,5$ mgFe²⁺/óra és a K_S $0,717$ g/l volt.

A szaporodási és vas-redukciós tulajdonságok összefüggését tekintve glükózon csak a mikrobák szaporodása gyakorolt jelentős hatást a vas-redukcióra, míg a maltóz esetében a sejtszám is jelentősen befolyásolta.

Megvizsgáltam a *S. xiamenensis* DSMZ 22215 törzs tapadási képességét különböző természetű felületen (polisztirol, alumínium, acél, grafit). Megállapítottam, hogy a mikroba képes megtapadni az általam vizsgált felületeken. A legnagyobb megtapadt sejtömeg a szálas szerkezetű grafiton, míg a legkevesebb a kevésbé érdes fémfelületeken volt kimutatható. A tápközeg vas(III)-ionokkal való kiegészítése csökkentette a mikroba tapadási képességét.

Vizsgáltam a mikroba elektromosan vezetőképes fehérje és extracelluláris flavin (redox-mediátor) termelését különböző körülmények között (aerob, anaerob+Fe³⁺ és MÜC). Anaerob minták esetében nagyobb mennyiségű extracelluláris fehérjetartalmat ($2,47 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/10^7$ TKE) mértem és a fehérjék vezetőképesége ($0,0267$ mS/ 10^7 TKE) is jelentősen meghaladta az aerob minták elektromos vezetőképeségét ($0,0172$ mS/ 10^7 TKE). Anaerob mintáknál szignifikánsan nagyobb mennyiségű flavintartalmat ($8,38 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/10^7$ TKE) mértem a fermentlében, mint az aerob minták esetén ($0,17 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/10^7$ TKE). Ez az eredmény megerősíti a feltételezést, hogy a flavin vegyületeknek jelentős hatása van a mikrobák elektronláncának kialakításában. Oldott oxigén jelenlétében a terminális oxidáció a sejten belül végbe megy, így nem szükséges a mikrobáknak mediátor vegyületeket szintetizálni. Továbbá bebizonyítottam, hogy az exogén riboflavin adagolása növeli a mikroba elektromos áramképzését.

Mikrobiális üzemanyagcella konstrukció fejlesztését is elvégeztem, mind az anód mind a katód esetében. A vezetőképes gél létrehozásához alginát-polianilin kopolimert és grafitport használtam. Megállapítottam, hogy $0,01$ g/ml koncentrációjú anilin hozzáadása hatszorosára növelte a gél-elektrod vezetőképeségét ($3,4$ S/mm-ről $21,5$ S/mm-re), míg $0,02$ g/ml PANI hatására 10-szeresre növekedett a módosított gél vezetőképesége ($35,5$ S/mm-re). $0,03$ g/ml grafitpor mennyiség $27,8$ S/mm-re, míg $0,05$ g/ml grafitpor 10-szeresére ($3,4$ S/mm-ről $33,3$ S/mm-re) növelte a gélek vezetőképeségét. A polianilin és grafitpor egyidejű alkalmazása

szignifikánsan megnövelte az elektród vezetőképességét. 0,01 g/ml PANI és 0,03 g/ml grafitpor együttesen 22-szeres vezetőképesség növekedést okozott, míg további koncentráció növelés, 0,05 g/ml grafitpor és 0,02 g/ml PANI koncentráció, 105-szörös elektromos vezetőképesség változást (3,4 S/mm-ről 366 S/mm-re) eredményezett. Azt tapasztaltam, hogy további vezetőképességet növelő anyag hozzáadása a gél-szerkezet stabilitásának, flexibilitásának jelentős csökkenését okozta.

Létrehoztam olyan MÜC rendszert, amely alkalmazta a vezetőképes gél-anódot rögzített mikrobákkal (*Shewanella algae* DSMZ 9167 törzs). Bizonyítottam, hogy a MÜC képes volt szakaszos, fél-folytonos és folytonos üzemi működésre. Szakaszos üzemben az elektromos feszültség 1,5-szörösre nőtt 0,01 g/ml és több mint kétszeresére 0,02 g/ml koncentrációjú anilin hozzáadás hatására, ami az üzemanyagcella fajlagos teljesítményének két- és háromszoros növekedését jelenti (1,45 W/m³-ről 3,02 és 4,39 W/m³-re változott). 0,05 g/ml koncentráció grafitpor hozzáadása a cella elektromos feszültségét kétszeresére (0,17 V-ről 0,34 V-re) és fajlagos teljesítményét négyszeresére növelte (1,45 W/m³-ről 5,77 W/m³-re). Továbbá a polianilin és grafitpor együttes alkalmazása szintén nagyobb elektromos teljesítményt eredményezett a mikrobiális üzemanyagcellákban. 0,02 g/ml PANI és 0,05 g/ml grafitpor hozzáadás háromszorosára növelte a MÜC elektromos feszültségét (0,17 V-ről 0,44 V-re), és több mint hétszeresére a fajlagos teljesítményét (1,45 W/m³-ről 9,86 W/m³-ra).

Fél-folytonos üzemmódban a beoltást követő időintervallumban az áramtermelés folyamatosan növekedett. Miután a teljesítmény elérte a maximumát (7,88 W/m³) az áramtermelés gyorsan csökkent a szubsztrátum fogyás hatására. Az új tápanyag hozzáadása a mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramtermelését ismét megnövelte.

Folytonos üzemmódban is működtettem a gél-elektrodos MÜC-öt. Azt tapasztaltam, hogy a betáplálási sebesség 0,5 ml/órától 2 ml/óra történő emelése 2,5-szörösére növelte az üzemanyagcella fajlagos teljesítményét (0,81-ről 3,55 W/m³-re). 3 ml/órás szubsztrátum betáplálása az elektromos áram képzés maximumát (7,92 W/m³) eredményezte és ez az érték stabil maradt a mérés végéig (3 napig). Megállapítottam, hogy a betáplálási térfogatáram további emelése már nem növelte jelentősen az elektromos áramtermelést, azonban a maximális teljesítmény hamarabb volt elérhető. A gélek mikroba-visszatartása megfelelő volt, nem volt tapasztalható a baktérium sejtek kimosódása. Az általam létrehozott új MÜC-rendszer lehetőséget nyújt folytonos technológia kialakítására, valamint védelmet nyújt a befertőződés ellen.

Nemesfém alapú lég-katód katalizátor helyettesítése céljából réz elektródra galvanizált nikkelt alkalmaztam. A létrehozott katód-katalizátor konstrukció megfelelően működött egykamrás mikrobiális üzemanyagcella rendszerben. A nikkellel bevont katóddal a legnagyobb feszültség 330 mV volt, 90 mW/m² fajlagos teljesítmény mellett. Bár a termelt elektromos áram

mennyisége még nem érte el a nemesfém katalizátorok esetében kapott eredményeket, a fajlagos költségeket tekintve kedvezőbb lehet ez a kialakítás.

Elért eredményeim tudományos és technológiai alapkutatások, de megítélésem szerint hozzájárulnak a mikrobiális üzemanyagcella technológia fejlesztéséhez.

9. SUMMARY

Microbial fuel cell (MFC) technology is a rapidly evolving and a very promising energy source alternative. This technology also has its advantages in the wastewater treatment processes. The history of electric current generation using microbes roots back for more than a hundred years. The first redox mediator aided MFC was created in the 1910's, mediator free MFCs started to appear in the 60's.

Despite of its recognized advantages the spread of the MFC technology is limited by the difficulty of scaling up to industrial sizes. The main limiting issues are the large volume of anode chamber that also requires a lot of space, the proton transport enhancement to the cathode chamber, the electron transport enhancement between microbes and electrodes, the gas emission and aeration of the cathode chamber, *etc.* The other limiting factor to the wide spread of the MFC technology is the microbial diversity and the metabolic diversity between strains that affects efficiency. The selection and improvement of the proper strain is essential for the creation of a successfully operating fuel cell technology. Furthermore the information about the electrogenic properties of different species and strains and the “know how” of a new type of electrode manufacturing are essential to build a stable and high performance MFC-system. In my PhD work I studied and made a performance improvement in this sense.

I examined the iron(III)-reduction capability of different microorganisms with and without methylene-blue mediator. This redox phenomena is performed through the donation of electrons to extracellular iron(III) ions through the coenzyme regeneration electron transport chain at anaerobic conditions on the outer cell membrane. It is a well-known fact, that the production of extracellular electrons is strongly correlated to the microbial propagation (primary metabolite), and the Fe^{3+} -reduction is significantly influenced by the microbial cell concentration. I experienced that, except of *Lactobacillus plantarum*, all of the examined microbes showed relevant Fe^{3+} -reduction in the presence and in the absence of redox mediators as well. This phenomenon proposes the production of electrons and their secretion into the extracellular matrix. In case of *Lactobacillus plantarum* species Fe^{3+} -ion reduction was detected only in the presence of methylene-blue, which means, that this strain could not directly transports it's electrons to extracellular acceptors.

I developed a rapid screening method for the estimation of the adequacy properties of different bacterial species in MFC systems. The method is based on the iron(III)-reduction capability by the selected microbes. I found a strong linear correlation between the microbial Fe^{3+} -reduction (**Model 1**), the cell count of the inoculation and the generated electricity.

$$\text{Model 1: } z = 41,771 \cdot x + 0,726 \cdot y + 1,513$$

where: z : electric current density (mA/m^2), x : absorbance change on 460 nm, y : logarithm of initial cell count (CFU/mL).

I also found that the inoculation with a higher cell count (10^6 CFU/mL) provides simpler, thus more elegant models. In this case the initial cell count is negligible that it can be left out from the model. The modified model is the following (**Model 2**).

$$\text{Model 2: } z = 46,04 x + 4,17$$

where: z : electric current density (mA/m^2), x : absorbance change on 460 nm.

In order to validate the models different *Geobacter* (*G. sulfurreducens*, *G. toluenoxydans*, *G. metallireducens*) and *Shewanella* (*S. algae*, *S. japonica*, *S. woody*) species were applied. The absorbance change results due to the iron(III)-reduction in the assays were inserted in the created models and they were compared to the electric current density and capacity results of the MFC. My conclusion, according to the data, is that the method with the application of my models is an adequate procedure to predict the microbial electricity generation in MFC systems.

I determined the electric current generation properties of two barely-known bacterial species. During the experiments and the data evaluation from the propagation properties of *Geobacter toluenoxydans* a substrate inhibition kinetic was discovered when higher than 2 g/L sodium-acetate concentration was applied. This propagation kinetics can be described by the Luong model, with the following kinetic constants: $\mu_{\max} = 0.033$ 1/h; $K_S = 0.205$ g/L; $n = 1.1$; $S_{\max} = 3.10$ g/L. The microbe could not propagate when the medium contains higher Na-acetate concentration than 3.1 g/L.

In case of the Fe^{3+} -reduction also substrate inhibition kinetics was discovered when sodium-acetate concentration reaches a higher level than 2 g/L. In this case the Haldane model could be used to describe the iron-reduction kinetics with the smallest error: $\mu_{\max}^P = 0.12$ mg Fe^{3+} /h, $K_S = 0.18$ g/L, $K_{SI} = 1.10$ g/L. I concluded, that Na-acetate concentrations, higher than 1.104 g/L strongly inhibit the iron-reduction ability of *G. toluenoxydans*.

The correlation between microbial propagation and iron(III)-reduction was tested and evaluated by the Luedeking-Piret method. According to the results both the growth rate and the number of the starter cell count have relevant effect on the iron(III)-reduction, this way causing the electricity generation.

In case of *Shewanella xiamenensis* DSMZ 22215 strain a comprehensive electrogenic profile analysis was performed. I studied the substrate utilization of this strain at anaerobic condition in presence of iron(III)-ions. During the propagation kinetic experiments I experienced higher cell growth rates with glucose containing media, then the similar experiences were found with maltose too. Although when iron(III)-reduction kinetics was evaluated the production of iron(II)-ions were more intense with the maltose containing media, then with glucose. Furthermore I conclude, that

the propagation of *S. xiamenensis* can be described by the Monod model with the following constants:

glucose substrate: $\mu_{\max} = 0.12$ 1/h, $K_S = 0.89$ g/L

maltose substrate: $\mu_{\max} = 0.096$ 1/h, $K_S = 1.0$ g/L

Using maltose or maltodextrin substrates significantly higher iron(III)-reduction was detected, than with glucose, galactose or lactose. I determined the parameters of iron(III)-reduction kinetics of *S. xiamenensis* with glucose or maltose substrates using Lineweaver-Burk graphical method. In case of maltose substrates the maximal reduction rate and K_S were 73.6 mgFe²⁺/h and 0.196 g/L, respectively, while in case of glucose the values were 62.5 mgFe²⁺/h and 0.717 g/L respectively. The evaluation of correlation between iron-reduction and growth properties suggested that only the growth rate had a relevant effect on the iron-reduction when using glucose substrate, while with maltose substrate both growth rate and the number of residing microbes has significant effect.

The adhesive properties of *S. xiamenensis* DSMZ 22215 strain were also tested on different surfaces such as polystyrene, aluminum, stainless steel and graphite. According to the results I confirmed the adhesive property of the microbe on various surfaces like polystyrene, aluminum, steel or graphite. The highest attached cell count was detected on the graphite plate having fibrous structure, while on less rough metal surfaces, the adhesion was significantly lower. The addition of iron(III)-ions to the nutrient broth relevantly decreased the adhesive properties of the microbes. The production of electrical conductive proteins and extracellular flavin materials (redox shuttle) of the microbe was also studied under different incubation conditions (aerobic, anaerobic+Fe³⁺, MFC). In case of anaerobic samples significantly higher quantity of extracellular proteins (2.47±0.05 µg/10⁷ CFU) were found and the electric conductivity of the proteins (0.0267 mS/10⁷ CFU) were appeared to be considerably higher than the conductivity of aerobic samples

(0.0172 mS/10⁷ CFU). In case of anaerobic samples significantly higher quantity of flavin content (8.38±0.05 µg/10⁷ CFU) was measured in the extracellular matrix, than in case of aerobic incubation (0.17±0.01 µg/10⁷ CFU). These results confirm the assumption that flavin type materials have relevant effect on the creation of electron chain of the microbes. In the presence of dissolved oxygen the terminal oxidation takes place intracellularly, therefore the synthesis of shuttle molecules are not necessary. This assumption was confirmed by the fact, that addition of exogenic riboflavin to the medium has significantly increased the electricity production of the microbe.

I performed engineering of anode and cathode structure as well. Alginate-polyaniline copolymer and graphite powder were used to create an electrically conductive gel-type electrode. My conclusion is that already a 0.01 g/mL of aniline could boost the electric conductivity to 6-

folds higher (from 3.4 S/mm to 21.5 S/mm), while 0.02 g/mL addition of PANI increased the conductivity of the gel-electrode 10-folds higher (to 35.5 S/mm). 0.03 g/mL concentration of graphite powder increased the electric conductivity to 27.8 S/mm, while 0.05 g/mL graphite powder to 33.3 S/mm of the modified gels. The simultaneous application of PANI and graphite powder significantly increased the conductivity of the electrode. 0.01 g/mL PANI and 0.03 g/mL graphite powder showed a 22-folds higher conductivity increase, while further addition of these materials such as 0.05 g/mL graphite powder and 0.02 g/mL PANI concentrations increased the electric conductivity 105-folds higher (from 3.4 S/mm to 366 S/mm). Further addition of these compounds caused a considerable decrease of stability and flexibility of the gel-structure. I created an MFC system, which utilized the conductive gel-anodes filled with electrogenic culture (*Shewanella algae* DSMZ 9167). I tested the application of this system in batch, semi-continuous and continuous operation modes. In batch operation the voltage increased 1,5-folds higher in case of 0.01 g/mL and almost double in case of 0.02 g/mL aniline concentrations, which meant a two and three times higher power-density in the fuel cell (from 1.45 W/m³ to 3.02 and to 4,39 W/m³). When adding 0.05 g/ml graphite powder, the voltage of the cell increased to almost the double of the former 0.17 V to 0.34 V, and a 4-times higher power-density (from 1.45 W/m³ to 5.77 W/m³) was detected. The simultaneous application of polyaniline and graphite caused the increase of electric performance of the MFC as well. The addition of 0.02 g/mL PANI and 0.05 g/mL graphite resulted in a 3-folds higher voltage production (from 0.17 V to 0.44 V), and in a more than 7-folds higher power-density (from 1.45 W/m³ to 9.86 W/m³). In semi-continuous operation mode, soon after the inoculation the electricity production constantly increased. When the electric power reached its maximum (7.88 W/m³) the electricity production started to decrease rapidly due to the substrate depletion. The replacement of the nutrient media turned around the process increasing the electron production in the MFC.

I tested the gel-electrode MFC in continuous operation mode as well. I observed that the increase of feed rate from 0.5 mL/h to 2 mL/h resulted in a 2.5-folds higher power-density of the fuel cell (from 0.81 to 3.55 W/m³). Having a feed rate of 3 mL/h substrate, the maximum of the electricity performance was reached at 7.92 W/m³. This value showed to be stable during the 3 days experiment. I found that the further increase of feed rate did not change considerably the electric performance of the MFC, however the maximum power-density could be reached earlier. The retention of microbes in the conductive gels were also sufficient, since no microbe wash out could have been detected. This electrode type provides the possibility to create a continuously operated MFC system, which protects the microbes from the infections.

In order to replace noble metal containing cathode constructions a nickel coated electrode on a copper carrier was created. This new cathode construction worked properly in a single chamber

MFC system. The cathode coated with nickel generated 330 mV voltage, and the power-density was 90 mW/m². The quantity of the produced electric current did not reach the performance of the noble metal constructions, however the specific costs of this new cathode catalyst are more favorable.

With my new scientific results I present the basics of the technology, these results also have a relevant contribution to the development of the microbial fuel cell technology.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1995. évi LIII. Törvény a környezet védelmének általános szabályairól

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(10), 3388-3394. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es0525511>

AELTERMAN, P., VERSICHELE, M., MARZORATI, M., BOON, N., VERSTRAETE, W. (2008). Loading rate and external resistance control the electricity generation of microbial fuel cells with different three-dimensional anodes. *Bioresource Technology*, 99(18), 8895-8902. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.061>

AKMAN, D., CIRIK, K., OZDEMIR, S., OZKAYA, B., CINAR, O. (2013). Bioelectricity generation in continuously-fed microbial fuel cell: Effects of anode electrode material and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 149, 459-464. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.102>

ANSARI, M. O., KHAN, M. M., ANSARI, S. A., AMAL, I., LEE, J., CHO, M. H. (2014). pTSA doped conducting graphene/polyaniline nanocomposite fibers: Thermoelectric behavior and electrode analysis. *Chemical Engineering Journal*, 242, 155-161. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.033>

APPLEBY, A. J. (1996). Fuel cell technology: Status and future prospects. *Energy*, 21(7-8), 521-653. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0360-5442\(96\)00030-8](http://dx.doi.org/10.1016/0360-5442(96)00030-8)

BABANOVA, S., HUBENOVA, Y., MITOV, M. (2011). Influence of artificial mediators on yeast-based fuel cell performance. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(4), 379-387. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.06.008>

BAGOTZKY, V. S., OSEUROVA, N. V., SKUNDIN, A. M. (2003). Fuel cells: State-of-the-art and major scientific and engineering problems. *Russian Journal of Electrochemistry*, 39(9), 919-934. Doi: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1025719619261>

BARANYAI, L. (2012): R: függvényillesztés. <http://www.baranyailaszlo.hu/2011/01/14/r-fueggveny-illesztes>

BASAVARAJA, C., DO, S. H., JO, E. A. (2010a): *Alginate enhances formation of polyaniline alginate/titanium dioxide nanocomposites*. Inje University, Gimhae, South Korea, p.

BASAVARAJA, C., HUH, D. S., JO, E. A. (2010b): *Alginate enhances formation of polyaniline alginate/titanium dioxide nanocomposites*. Inje University, Gimhae, South Korea, 1-2 p.

BEENKEN, K. E., BLEVINS, J. S., SMELTZER, M. S. (2003). Mutation of sarA in Staphylococcus aureus limits biofilm formation. *Infection and Immunity*, 71(7), 4206-4211. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.71.7.4206-4211.2003>

BELIAEV, A. S., SAFFARINI, D. A., MCLAUGHLIN, J. L., HUNNICUTT, D. (2001). MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in Shewanella putrefaciens MR-1. *Molecular Microbiology*, 39(3), 722-730. Doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02257.x>

BEN LIEW, K., DAUD, W. R. W., GHASEMI, M., LEONG, J. X., LIM, W. S., ISMAIL, M. (2014). Non-Pt catalyst as oxygen reduction reaction in microbial fuel cells: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(10), 4870-4883. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.062>

BIFFINGER, J. C., FITZGERALD, L. A., RAY, R., LITTLE, B. J., LIZEWSKI, S. E., PETERSEN, E. R., RINGEISEN, B. R., SANDERS, W. C., SHEEHAN, P. E., PIETRON, J. J., BALDWIN, J. W., NADEAU, L. J., JOHNSON, G. R., RIBBENS, M., FINKEL, S. E., NEALSON, K. H. (2011). The utility of Shewanella

- japonica for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(1), 290-297. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.078>
- BIFFINGER, J. C., PIETRON, J., BRETSCHEGER, O., NADEAU, L. J., JOHNSON, G. R., WILLIAMS, C. C., NEALSON, K. H., RINGEISEN, B. R. (2008). The influence of acidity on microbial fuel cells containing *Shewanella oneidensis*. *Biosensors & Bioelectronics*, 24(4), 900-905. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.034>
- BOND, D. R., LOVLEY, D. R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1548-1555. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>
- BOWMAN, J. P., MCCAMMON, S. A., NICHOLS, D. S., SKERRATT, J. H., REA, S. M., NICHOLS, P. D., McMEEKIN, T. A. (1997). *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 omega 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1040-1047.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BRUTINEL, E. D., GRALNICK, J. A. (2012). Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 41-48. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3653-0>
- CACCAVO, F., LONERGAN, D. J., LOVLEY, D. R., DAVIS, M., STOLZ, J. F., MCINERNEY, M. J. (1994). *Geobacter Sulfurreducens* Sp-Nov, a Hydrogen-Oxidizing and Acetate-Oxidizing Dissimilatory Metal-Reducing Microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3752-3759.
- CAI, H., WANG, J., BU, Y. F., ZHONG, Q. (2013). Treatment of carbon cloth anodes for improving power generation in a dual-chamber microbial fuel cell. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(4), 623-628. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.3875>
- CAO, X. X., HUANG, X., ZHANG, X. Y., LIANG, P., FAN, M. Z. (2009). A mini-microbial fuel cell for voltage testing of exoelectrogenic bacteria. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 3(3), 307-312. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11783-009-0028-1>
- CHAUDHURI, S. K., LOVLEY, D. R. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1229-1232. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt867>
- CHEN, J. Y., LI, N., ZHAO, L. (2014). Three-dimensional electrode microbial fuel cell for hydrogen peroxide synthesis coupled to wastewater treatment. *Journal of Power Sources*, 254, 316-322. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.12.114>
- CHENG, S., LIU, H., LOGAN, B. E. (2006a). Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure. *Electrochemistry Communications*, 8(3), 489-494. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2006.01.010>
- CHENG, S., LIU, H., LOGAN, B. E. (2006b). Power densities using different cathode catalysts (Pt and CoTMP) and polymer binders (Nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*, 40(1), 364-369. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es0512071>
- CHENG, S. A., LOGAN, B. E. (2011). Increasing power generation for scaling up single-chamber air cathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(6), 4468-4473. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.104>

- COPPI, M. V., LEANG, C., SANDLER, S. J., LOVLEY, D. R. (2001). Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3180-3187. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.7.3180-3187.2001>
- CUSICK, R. D., BRYAN, B., PARKER, D. S., MERRILL, M. D., MEHANNA, M., KIELY, P. D., LIU, G. L., LOGAN, B. E. (2011). Performance of a pilot-scale continuous flow microbial electrolysis cell fed winery wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(6), 2053-2063. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3130-9>
- DU, Z., LI, H., GU, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*, 25(5), 464-482 Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.004>
- DUMAS, C., MOLLIKA, A., FERON, D., BASSEGUY, R., ETCHEVERRY, L., BERGEL, A. (2007). Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials. *Electrochimica Acta*, 53(2), 468-473. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2007.06.069>
- ESTEVE-NUNEZ, A., ROTHERMICH, M., SHARMA, M., LOVLEY, D. (2005). Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Environmental Microbiology*, 7(5), 641-648. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00731.x>
- FENG, C. H., YUE, X. J., LI, F. B., WEI, C. H. (2013). Bio-current as an indicator for biogenic Fe(II) generation driven by dissimilatory iron reducing bacteria. *Biosensors & Bioelectronics*, 39(1), 51-56. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.037>
- FENG, Y. J., YANG, Q., WANG, X., LOGAN, B. E. (2010). Treatment of carbon fiber brush anodes for improving power generation in air-cathode microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 195(7), 1841-1844. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.10.030>
- FLAHAUT, E., DURRIEU, M. C., REMY-ZOLGHADRI, M., BAREILLE, R., BAQUEY, C. (2006). Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon*, 44(6), 1093-1099. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2005.11.007>
- FRANKS, A. E., NEVIN, K. P. (2010). Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies*, 3(5), 899-919. Doi: <http://dx.doi.org/10.3390/en3050899>
- FREDRICKSON, J. K., ROMINE, M. F., BELIAEV, A. S., AUCHTUNG, J. M., DRISCOLL, M. E., GARDNER, T. S., NEALSON, K. H., OSTERMAN, A. L., PINCHUK, G., REED, J. L., RODIONOV, D. A., RODRIGUES, J. L. M., SAFFARINI, D. A., SERRES, M. H., SPORMANN, A. M., ZHULIN, I. B., TIEDJE, J. M. (2008). Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 592-603. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1947>
- GASPARD, S., VAZQUEZ, F., HOLLIGER, C. (1998). Localization and solubilization of the iron(III) reductase of *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3188-3194. Doi:
- GHANGREKAR, M. M., SHINDE, V. B. (2007). Performance of membrane-less microbial fuel cell treating wastewater and effect of electrode distance and area on electricity production. *Bioresour Technol*, 98(15), 2879-2885. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.050>
- GIL, G. C., CHANG, I. S., KIM, B. H., KIM, M., JANG, J. K., PARK, H. S., KIM, H. J. (2003). Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosensors & Bioelectronics*, 18(4), 327-334. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0956-5663\(02\)00110-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0956-5663(02)00110-0)
- GRASS, G., RENSING, C., SOLIOZ, M. (2011). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1541-1547. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02766-10>
- GUISEPPI-ELIE, A. (2010). Electroconductive hydrogels: Synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials*, 31(10), 2701-2716. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.052

- GURUNG, A., KIM, J., JUNG, S., JEON, B. H., YANG, J. E., OH, S. E. (2012). Effects of substrate concentrations on performance of serially connected microbial fuel cells (MFCs) operated in a continuous mode. *Biotechnology Letters*, 34(10), 1833-1839. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-012-0979-3>
- GURUNG, A., OH, S. E. (2012). The Performance of Serially and Parallely Connected Microbial Fuel Cells. *Energy Sources Part a-Recovery Utilization and Environmental Effects*, 34(17), 1591-1598. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/15567036.2011.629277>
- HABERMANN, W., POMMER, E. H. (1991). Biological fuel-cells with sulfide storage capacity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(1), 128-133. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00180650>
- HAILE, S. M. (2003). Fuel cell materials and components. *Acta Materialia*, 51(19), 5981-6000. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actamat.2003.08.004>
- HALDANE, J. B. S. (1930): *Union of enzymes with substrate. Enzymes. Longmans, Green & Co.*, 28-53 p.
- HAYASHI, K., SASAKI, Y., TAGASHIRA, S., SOMA, Y., ICHINOSE, T., AKIYAMA, H. (1986). A Sensitive Spectrophotometric Determination of Iron(III) with Amines and Thiocyanate. *Analytical Sciences*, 2(5), 457-460. Doi: <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.2.457>
- HE, Z., MINTEER, S. D., ANGENENT, L. T. (2005). Electricity generation from artificial wastewater using an upflow microbial fuel cell. *Environmental Science & Technology*, 39(14), 5262-5267. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es0502876>
- HE, Z., WAGNER, N., MINTEER, S. D., ANGENENT, L. T. (2006). An upflow microbial fuel cell with an interior cathode: Assessment of the internal resistance by impedance Spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 40(17), 5212-5217. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es060394f>
- HERRERO-HERNANDEZ, E., SMITH, T. J., AKID, R. (2013). Electricity generation from wastewaters with starch as carbon source using a mediatorless microbial fuel cell. *Biosensors & Bioelectronics*, 39(1), 194-198. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.037>
- HOSSEINI, M. G., AHADZADEH, I. (2012). A dual-chambered microbial fuel cell with Ti/nano-TiO₂/Pd nano-structure cathode. *Journal of Power Sources*, 220, 292-297. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.07.096>
- HOU, H. J., LI, L., CHO, Y., DE FIGUEIREDO, P., HAN, A. (2009). Microfabricated Microbial Fuel Cell Arrays Reveal Electrochemically Active Microbes. *Plos One*, 4(8), 8. Doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006570>
- HUANG, J. X., SUN, B. L., ZHANG, X. B. (2010). *Shewanella xiamenensis* sp nov., isolated from coastal sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1585-1589. Doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.013300-0>
- HUANG, L. P., REGAN, J. M., QUAN, X. (2011). Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Bioresour Technol*, 102(1), 316-323. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.096>
- IZALLALEN, M., MAHADEVAN, R., BURGARD, A., POSTIER, B., DIDONATO, R., SUN, J., SCHILLING, C. H., LOVLEY, D. R. (2008). *Geobacter sulfurreducens* strain engineered for increased rates of respiration. *Metabolic Engineering*, 10(5), 267-275. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2008.06.005>
- JAFARY, T., GHOREYSHI, A. A., NAJAFPOUR, G. D., FATEMI, S., RAHIMNEJAD, M. (2013). Investigation on performance of microbial fuel cells based on carbon sources and kinetic models. *International Journal of Energy Research*, 37(12), 1539-1549. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/er.2994>

- JANG, J. K., PHAM, T. H., CHANG, I. S., KANG, K. H., MOON, H., CHO, K. S., KIM, B. H. (2004). Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell. *Process Biochemistry*, 39(8), 1007-1012. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00203-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00203-6)
- JUNG, S., REGAN, J. M. (2007). Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2), 393-402. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-1162-y>
- KASHEFI, K., SHELOBOLINA, E. S., ELLIOTT, W. C., LOVLEY, D. R. (2008). Growth of thermophilic and hyperthermophilic Fe (III)-reducing microorganisms on a ferruginous smectite as the sole electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 251-258. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01580-07>
- KIM, B. H., CHANG, I. S., GADD, G. M. (2007). Challenges in microbial fuel cell development and operation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 485-494. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-1027-4>
- KIM, H. J., PARK, H. S., HYUN, M. S., CHANG, I. S., KIM, M., KIM, B. H. (2002). A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2), 145-152. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(01\)00478-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(01)00478-1)
- KIM, M. S., LEE, Y. J. (2010). Optimization of culture conditions and electricity generation using *Geobacter sulfurreducens* in a dual-chambered microbial fuel-cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(23), 13028-13034. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.061>
- KIRUBAKARAN, A., JAIN, S., NEMA, R. K. (2009). A review on fuel cell technologies and power electronic interface. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(9), 2430-2440. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.04.004>
- KRIEG, T., SYDOW, A., SCHRODER, U., SCHRADER, J., HOLTMANN, D. (2014). Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion. *Trends in Biotechnology*, 32(12), 645-655. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.004>
- KUMAR, G. G., SARATHI, V. G. S., NAHM, K. S. (2013). Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells. *Biosensors & Bioelectronics*, 43, 461-475. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.048>
- KUNAPULI, U., JAHN, M. K., LUEDERS, T., GEYER, R., HEIPIEPER, H. J., MECKENSTOCK, R. U. (2010). *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp nov and *Geobacter toluenoxydans* sp nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 686-695. Doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.003525-0>
- LAI, B., TANG, X. H., LI, H. R., DU, Z. W., LIU, X. W., ZHANG, Q. (2011). Power production enhancement with a polyaniline modified anode in microbial fuel cells. *Biosensors & Bioelectronics*, 28(1), 373-377. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.050>
- LEFEVRE, M., DODELET, J. P. (2003). Fe-based catalysts for the reduction of oxygen in polymer electrolyte membrane fuel cell conditions: determination of the amount of peroxide released during electroreduction and its influence on the stability of the catalysts. *Electrochimica Acta*, 48(19), 2749-2760. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0013-4686\(03\)00393-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0013-4686(03)00393-1)
- LENTINI, C. J., WANKEL, S. D., HANSEL, C. M. (2012). Enriched iron(III)-reducing bacterial communities are shaped by carbon substrate and iron oxide mineralogy. *Frontiers in Microbiology*, 3. Doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00404>
- LI, H., LIU, H., JONG, Z., QU, W., GENG, D. S., SUN, X. L., WANG, H. J. (2011). Nitrogen-doped carbon nanotubes with high activity for oxygen reduction in alkaline media. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(3), 2258-2265. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.025>

- LIU, H., RAMNARAYANAN, R., LOGAN, B. E. (2004). Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environmental Science & Technology*, 38(7), 2281-2285. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es034923g>
- LIU, J., FENG, Y., WANG, X., YANG, Q., SHI, X., QU, Y., REN, N. (2012a). The effect of water proofing on the performance of nickel foam cathode in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 198, 100-104. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.09.078>
- LIU, X., DU, X., WANG, X., LI, N., XU, P., DING, Y. (2012b). Improved microbial fuel cell performance by encapsulating microbial cells with a nickel-coated sponge. *Biosensors and Bioelectronics*. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.014>
- LOYD, J. R., BLUNT-HARRIS, E. L., LOVLEY, D. R. (1999). The periplasmic 9.6-kilodalton c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* is not an electron shuttle to Fe(III). *Journal of Bacteriology*, 181(24), 7647-7649.
- LOGAN, B. E. (2008). *Microbial fuel cells*. New Jersey: Wiley.
- LOGAN, B. E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 375-381. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2113>
- LOGAN, B. E. (2010). Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1665-1671. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2378-9>
- LOGAN, B. E., HAMELERS, B., ROZENDAL, R. A., SCHRORDER, U., KELLER, J., FREGUIA, S., AELTERMAN, P., VERSTRAETE, W., RABAEY, K. (2006). Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, 40(17), 5181-5192. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es0605016>
- LOKESH, B. G., RAO, K., REDDY, K. M., RAO, K. C., RAO, P. S. (2008). Novel nanocomposite membranes of sodium alginate filled with polyaniline-coated titanium dioxide for dehydration of 1,4-dioxane/water mixtures. *Desalination*, 233(1-3), 166-172. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2007.09.039>
- LOVLEY, D. R. (2006a). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms (vol 4, pg 497, 2006). *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 797-797. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1442>
- LOVLEY, D. R. (2006b). Microbial energizers: Fuel cells that keep on going *Microbe*, 1(7), 323- 329.
- LOVLEY, D. R. (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 564-571. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.10.005>
- LOVLEY, D. R. (2012). Long-range electron transport to Fe(III) oxide via pili with metallic-like conductivity. *Biochemical Society Transactions*, 40, 1186-1190. Doi: <http://dx.doi.org/10.1042/bst20120131>
- LOVLEY, D. R., PHILLIPS, E. J. P. (1988). Novel Mode of Microbial Energy-Metabolism - Organic-Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1472-1480.
- LOVLEY, D. R., UEKI, T., ZHANG, T., MALVANKAR, N. S., SHRESTHA, P. M., FLANAGAN, K. A., AKLUJKAR, M., BUTLER, J. E., GILTEAUX, L., ROTARU, A. E., HOLMES, D. E., FRANKS, A. E., ORELLANA, R., RISSO, C., NEVIN, K. P. (2011): *Geobacter: The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications*. *Advances in Microbial Physiology, Vol 59*. Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, 59, 1-100 p.
- LOWY, D. A., TENDER, L. M., ZEIKUS, J. G., PARK, D. H., LOVLEY, D. R. (2006). Harvesting energy from the marine sediment-water interface II - Kinetic activity of anode materials. *Biosensors & Bioelectronics*, 21(11), 2058-2063. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.033>

- LU, M., KHARKWAL, S., NG, H. Y., LI, S. F. Y. (2011). Carbon nanotube supported MnO₂ catalysts for oxygen reduction reaction and their applications in microbial fuel cells. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(12), 4728-4732. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.05.036>
- LUEDEKING, R., PIRET, E. L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1(4), 393-412. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jbmte.390010406>
- LUONG, J. H. T. (1987). Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate-inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(2), 242-248. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260290215>
- LUU, Y. S., RAMSAY, J. A. (2003). Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe(III) as an energy source. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19(2), 215-225. Doi: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1023225521311>
- MAGNUSON, T. S., HODGES-MYERSON, A. L., LOVLEY, D. R. (2000). Characterization of a membrane-bound NADH-dependent Fe³⁺ reductase from the dissimilatory Fe³⁺-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*. *Fems Microbiology Letters*, 185(2), 205-211. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09063.x>
- MAGNUSON, T. S., ISOYAMA, N., HODGES-MYERSON, A. L., DAVIDSON, G., MARONEY, M. J., GEESSEY, G. G., LOVLEY, D. R. (2001). Isolation, characterization and gene sequence analysis of a membrane-associated 89 kDa Fe(III) reducing cytochrome c from *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemical Journal*, 359, 147-152. Doi: <http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3590147>
- MANOHAR, A. K., BRETSCHGER, O., NEALSON, K. H., MANSFELD, F. (2008). The use of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the evaluation of the electrochemical properties of a microbial fuel cell. *Bioelectrochemistry*, 72(2), 149-154. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.01.004>
- MINTEER, S. D., ATANASSOV, P., LUCKARIFT, H. R., JOHNSON, G. R. (2012). New materials for biological fuel cells. *Materials Today*, 15(4), 166-173. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70070-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70070-6)
- MOHAN, S. V., MOHANAKRISHNA, G., SRIKANTH, S., SARMA, P. N. (2008). Harnessing of bioelectricity in microbial fuel cell (MFC) employing aerated cathode through anaerobic treatment of chemical wastewater using selectively enriched hydrogen producing mixed consortia. *Fuel*, 87(12), 2667-2676. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2008.03.002>
- MOON, H., CHANG, I. S., KIM, B. H. (2006). Continuous electricity production from artificial wastewater using a mediator-less microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.*, 97, 621-627. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.027>
- MYERS, C. R., MYERS, J. M. (1992). Localization of cytochromes to the outer-membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology*, 174(11), 3429-3438.
- MYERS, C. R., MYERS, J. M. (1997). Outer membrane cytochromes of *Shewanella putrefaciens* MR-1: Spectral analysis, and purification of the 83-kDa c-type cytochrome. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1326(2), 307-318. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2736\(97\)00034-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2736(97)00034-5)
- OLAH, G., GOEPPERT, A., PRAKASH, S. G. K. (2007). *Kőolaj és földgáz után: a METANOLGAZDASÁG*. Budapest: Better Kiadó.
- OLIVEIRA, V. B., SIMOES, M., MELO, L. F., PINTO, A. (2013). Overview on the developments of microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal*, 73, 53-64. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.012>

- OUITRAKUL, S., SRIYUDTHSAK, M., CHAROJROCHKUL, S., KAKIZONO, T. (2007). Impedance analysis of bio-fuel cell electrodes. *Biosensors & Bioelectronics*, 23(5), 721-727. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2007.08.012>
- PARK, D. H., ZEIKUS, J. G. (2000). Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1292-1297. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.4.1292-1297.2000>
- PARK, D. H., ZEIKUS, J. G. (2002). Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 58-61. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-0972-1>
- PARK, D. H., ZEIKUS, J. G. (2003). Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3), 348-355. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10501>
- PHAM, T. H., JANG, J. K., CHANG, I. S., KIM, B. H. (2004). Improvement of cathode reaction of a mediatorless microbial fuel cell. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 324-329.
- PICIOREANU, C., HEAD, I. M., KATURI, K. P., VAN LOOSDRECHT, M. C. M., SCOTT, K. (2007). A computational model for biofilm-based microbial fuel cells. *Water Research*, 41(13), 2921-2940. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.009>
- PRASAD, D., ARUN, S., MURUGESAN, A., PADMANABAN, S., SATYANARAYANAN, R. S., BERCHMANS, S., YEGNARAMAN, V. (2007). Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell. *Biosensors & Bioelectronics*, 22(11), 2604-2610. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.10.028>
- QIAO, Y., LI, C. M., BAO, S. J., BAO, Q. L. (2007). Carbon nanotube/polyaniline composite as anode material for microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 170(1), 79-84. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.03.048>
- RABAEY, K., CLAUWAERT, P., AELTERMAN, P., VERSTRAETE, W. (2005a). Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environmental Science & Technology*, 39(20), 8077-8082. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es050986i>
- RABAEY, K., LISSENS, G., VERSTRAETE, W. (2005b): *Microbial fuel cells: performances and perspectives Biofuels for Fuel Cells: Renewable Energy from Biomass Fermentation*. IWA Publishing 1-30 p.
- RABAEY, K., READ, S. T., CLAUWAERT, P., FREGUIA, S., BOND, P. L., BLACKALL, L. L., KELLER, J. (2008). Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells. *Isme Journal*, 2(5), 519-527. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2008.1>
- RABAEY, K., VERSTRAETE, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, 23(6), 291-298. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.008>
- RAGHAVULU, S. V., GOUD, R. K., SARMA, P. N., MOHAN, S. V. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as anodic biocatalyst for power generation in biofuel cell: Influence of redox condition and substrate load. *Bioresource Technology*, 102(3), 2751-2757. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.048>
- RAHIMNEJAD, M., GHOREYSHI, A. A., NAJAFPOUR, G. D., YOUNESI, H., SHAKERI, M. (2012a). A novel microbial fuel cell stack for continuous production of clean energy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5992-6000. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.12.154>
- RAHIMNEJAD, M., NAJAFPOUR, G. D., GHOREYSHI, A. A., SHAKERI, M., ZARE, H. (2011). Methylene blue as electron promoters in microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(20), 13335-13341. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.07.059>

- RAHIMNEJAD, M., NAJAFPOUR, G. D., GHOREYSHI, A. A., TALEBNIA, F., PREMIER, G. C., BAKERI, G., KIM, J. R., OH, S. E. (2012b). Thionine increases electricity generation from microbial fuel cell using *Saccharomyces cerevisiae* and exoelectrogenic mixed culture. *Journal of Microbiology*, 50(4), 575-580. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-012-2135-0>
- READ, S. T., DUTTA, P., BOND, P. L., KELLER, J., RABAAY, K. (2010). Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes. *Bmc Microbiology*, 10, 10. Doi: 98
10.1186/1471-2180-10-98
- REDDY, L. V., KUMAR, S. P., WEE, Y.-J. (2010): *Microbial Fuel Cells (MFCs) - a novel source of energy for new millennium. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. FORMATEX*, 2, 956-964 p.
- REGUERA, G., MCCARTHY, K. D., MEHTA, T., NICOLL, J. S., TUOMINEN, M. T., LOVLEY, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098-1101. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nature03661>
- REGUERA, G., NEVIN, K. P., NICOLL, J. S., COVALLA, S. F., WOODARD, T. L., LOVLEY, D. R. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7345-7348. Doi: 10.1128/aem.01444-06
- REICZIGEL, J., HARNOS, A., SOLYMOSI, N. (2010). *Biostatistika, nem statisztikusoknak*. Nagykovácsi: Pars Kft.
- RHOADS, A., BEYENAL, H., LEWANDOWSKI, Z. (2005). Microbial fuel cell using anaerobic respiration as an anodic reaction and biomineralized manganese as a cathodic reactant. *Environmental Science & Technology*, 39(12), 4666-4671. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es048386r>
- RINGEISEN, B. R., HENDERSON, E., WU, P. K., PIETRON, J., RAY, R., LITTLE, B., BIFFINGER, J. C., JONES-MEEHAN, J. M. (2006). High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environmental Science & Technology*, 40(8), 2629-2634. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es052254w>
- RODEN, E. E., KAPPLER, A., BAUER, I., JIANG, J., PAUL, A., STOESESSER, R., KONISHI, H., XU, H. F. (2010). Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. *Nature Geoscience*, 3(6), 417-421. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/ngeo870>
- ROSENBAUM, M., HE, Z., ANGENENT, L. T. (2010). Light energy to bioelectricity: photosynthetic microbial fuel cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 259-264. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.010>
- SAYED, E. T., TSUJIGUCHI, T., NAKAGAWA, N. (2012). Catalytic activity of baker's yeast in a mediatorless microbial fuel cell. *Bioelectrochemistry*, 86, 97-101. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.02.001>
- SEELIGER, S., CORD-RUWISCH, R., SCHINK, B. (1998). A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *Journal of Bacteriology*, 180(14), 3686-3691.
- SELEMBO, P. A., MERRILL, M. D., LOGAN, B. E. (2009). The use of stainless steel and nickel alloys as low-cost cathodes in microbial electrolysis cells. *Journal of Power Sources*, 190(2), 271-278. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2008.12.144>
- SHARMA, V., KUNDU, P. P. (2010). Biocatalysts in microbial fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(2), 193-193. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.013>
- STAMBOULI, A. B., TRAVERSA, E. (2002). Solid oxide fuel cells (SOFCs): a review of an environmentally clean and efficient source of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 6(5), 433-455. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1364-0321\(02\)00014-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1364-0321(02)00014-X)

- STEELE, B. C. H., HEINZEL, A. (2001). Materials for fuel-cell technologies. *Nature*, 414(6861), 345-352. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/35104620>
- STRAUB, K. L., SCHONHUBER, W. A., BUCHHOLZ-CLEVEN, B. E. E., SCHINK, B. (2004). Diversity of ferrous iron-oxidizing, nitrate-reducing bacteria and their involvement in oxygen-independent iron cycling. *Geomicrobiology Journal*, 21(6), 371-378. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/01490450490485854>
- SZENTIRMAI, A. (1996). *A mikrobiológia alapjai*. Debrecen: Kossuth Egyetemi Kiadó.
- SZÖLLÖSI, A., NARR, L., KOVÁCS, A. G., STYEVKÓ, G. (2015a). Relationship between kinetics of growth and production of exo-electrons: case study with *Geobacter toluenoxydans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62(3), 101-110. Doi: <http://dx.doi.org/10.1556/030.62.2015.3.8>
- SZÖLLÖSI, A., REZESSY-SZABÓ, J. M., HOSCHKE, Á., NGUYEN, Q. D. (2015b). Novel method for screening microbes for application in microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 179(0), 123-127. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.004>
- European Pharmacopoeia 01/2008:0292 (2008) Európa Tanács
- TARAFDER, P. K., THAKUR, R. (2005). Surfactant-mediated extraction of iron and its spectrophotometric determination in rocks, minerals, soils, stream sediments and water samples. *Microchemical Journal*, 80(1), 39-43. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2004.09.004>
- THAUER, R. K., JUNGERMANN, K., DECKER, K. (1977). Energy-conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(1), 100-180.
- TORRES, C. I., MARCUS, A. K., LEE, H. S., PARAMESWARAN, P., KRAJMALNIK-BROWN, R., RITTMANN, B. E. (2010). A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *Fems Microbiology Reviews*, 34(1), 3-17. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00191.x>
- TRINH, N. T., PARK, J. H., KIM, B. W. (2009). Increased generation of electricity in a microbial fuel cell using *Geobacter sulfurreducens*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(3), 748-753. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11814-009-0125-7>
- VARGA, B., SZILÁGYI, R. (2011). *Kvantitatív információképzési technikák*: Nemzeti Tankönyvkiadó.
- VELASQUEZ-ORTA, S. B., HEAD, I. M., CURTIS, T. P., SCOTT, K., LLOYD, J. R., VON CANSTEIN, H. (2011). The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1373-1381. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2172-8>
- VENKATA RAMANA, G., PADYA, B., SRIKANTH, V. V. S. S., JAIN, P. K., PADMANABHAM, G., SUNDARARAJAN, G. (2011). Electrically conductive carbon nanopipe-graphite nanosheet/polyaniline composites. *Carbon*, 49(15), 5239-5245. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2011.07.041>
- VON CASTEIN, H., OGAWA, J., SHIMIZU, S., LLOYD, J. R. (2008). Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 615-623. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01387-07>
- WANG, X., CHENG, S. A., FENG, Y. J., MERRILL, M. D., SAITO, T., LOGAN, B. E. (2009a). Use of Carbon Mesh Anodes and the Effect of Different Pretreatment Methods on Power Production in Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*, 43(17), 6870-6874. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es900997w>
- WANG, X. J., YANG, J., CHEN, X. P., SUN, G. X., ZHU, Y. G. (2009b). Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China. *Journal of Soils and Sediments*, 9(6), 568-577. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11368-009-0113-x>

- WANG, Z. J., WU, Y. C., WANG, L., ZHAO, F. (2014). Polarization behavior of microbial fuel cells under stack operation. *Chinese Science Bulletin*, 59(18), 2214-2220. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11434-014-0243-4>
- WATANABE, K. (2008). Recent Developments in Microbial Fuel Cell Technologies for Sustainable Bioenergy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(6), 528-536. Doi: <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.106.528>
- WATSON, V. J., LOGAN, B. E. (2010). Power Production in MFCs Inoculated With *Shewanella oneidensis* MR-1 or Mixed Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(3), 489-498. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22556>
- WEBER, K. A., ACHENBACH, L. A., COATES, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752-764. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1490>
- WEI, J. C., LIANG, P., HUANG, X. (2011). Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(20), 9335-9344. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.019>
- YOU, S. J., WANG, X. H., ZHANG, J. N., WANG, J. Y., REN, N. Q., GONG, X. B. (2011). Fabrication of stainless steel mesh gas diffusion electrode for power generation in microbial fuel cell. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(5), 2142-2146. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.023>
- YOU, S. J., ZHAO, Q. L., JIANG, J. Q., ZHANG, J. N., ZHAO, S. Q. (2006). Sustainable approach for leachate treatment: Electricity generation in microbial fuel cell. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 41(12), 2721-2734. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10934520600966284>
- YUAN, H. Y., HE, Z. (2015). Graphene-modified electrodes for enhancing the performance of microbial fuel cells. *Nanoscale*, 7(16), 7022-7029. Doi: <http://dx.doi.org/10.1039/c4nr05637j>
- YUAN, S. J., HE, H., SHENG, G. P., CHEN, J. J., TONG, Z. H., CHENG, Y. Y., LI, W. W., LIN, Z. Q., ZHANG, F., YU, H. Q. (2013). A Photometric High-Throughput Method for Identification of Electrochemically Active Bacteria Using a WO₃ Nanocluster Probe. *Scientific Reports*, 3, 7. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/srep01315>
- YUAN, Y., KIM, S. (2008). Improved performance of a microbial fuel cell with polypyrrole/carbon black composite coated carbon paper anodes. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29(7), 1344-1348. Doi: <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2008.29.7.1344>
- ZENG, L. Z., ZHAO, S. F., WANG, Y. Q., LI, H., LI, W. S. (2012). Ni/β-Mo 2C as noble-metal-free anodic electrocatalyst of microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(5), 4590- 4596. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.05.174>
- ZHANG, L. X., LIU, C. S., ZHUANG, L., LI, W. S., ZHOU, S. G., ZHANG, J. T. (2009). Manganese dioxide as an alternative cathodic catalyst to platinum in microbial fuel cells. *Biosensors & Bioelectronics*, 24(9), 2825-2829. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2009.02.010>
- ZHANG, X., JI, L. Y., ZHANG, S. C., YANG, W. S. (2007). Synthesis of a novel polyaniline-intercalated layered manganese oxide nanocomposite as electrode material for electrochemical capacitor. *Journal of Power Sources*, 173(2), 1017-1023. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.08.083>
- ZHAO, F., HARNISCH, F., SCHRORDER, U., SCHOLZ, F., BOGDANOFF, P., HERRMANN, I. (2006). Challenges and constraints of using oxygen cathodes in microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*, 40(17), 5193-5199. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es060332p>
- ZHOU, M., CHI, M., LUO, J., HE, H., JIN, T. (2011). An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 196(10), 4427-4435. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.01.012>

ZHU, C. Z., DONG, S. J. (2013). Recent progress in graphene-based nanomaterials as advanced electrocatalysts towards oxygen reduction reaction. *Nanoscale*, 5(5), 1753-1767. Doi: <http://dx.doi.org/10.1039/c2nr33839d>

ZOU, Y. J., SUN, L. X., XU, F., YANG, L. N. (2007). E-coli microbial fuel cell using new methylene blue as electron mediator. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 28(3), 510-513.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek dr. habil. Nguyen Duc Quangnak, hogy mind emberileg, mind szakmailag támogatott. A vele való megbeszélések minden esetben irányadóak voltak, és rámutattak újabb és újabb lehetőségekre kutatómunkámmal kapcsolatban. Áldozatos munkájával lendületet és kedvet adott a folytatáshoz.

Továbbá köszönöm a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszék minden munkatársának, köztük Hegyesné dr. Vecseri Beátának, Dr. Hoschke Ágostonnak, Rezessyné dr. Szabó Juditnak, Panyik Gábornénak dr., dr. Kun-Farkas Gabriellának, dr. Kun Szilárdnak, dr. Bujna Erikának, dr. Styevkó Gabriellának, Kovács Attila Gábornak, Fogarasi Attila Leventének és dr. Nagy Edina Szandrának a szakmai segítséget. Valamint bátyámnak, Szöllősi Dánielnek, és a Fizika-Automatika Tanszék és a Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék munkatársainak a mérésekhez nyújtott segítséget.

Köszönetet szeretnék mondani hallgatóimnak, Bárány Nándornak, Narr Lászlónak, Bolla Annának és Hegyi Lajosnak, hogy innovatív ötleteikkel hozzájárultak a disszertációm elkészüléséhez.

Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom páromnak Oravetz Cintióának és családomnak, azért hogy mindvégig megfelelő háttérrel biztosítottak, bíztattak vagy egyszerűen csak meghallgattak.