



Mikrobiális üzemanyagcella teljesítményének növelése

Doktori értekezés tézisei

SZÖLLŐSI ATTILA

**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 Szeszipari 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 témavezetők jóváhagyása

1. A munka előzményei

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 az 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.).

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 jellemző alacsony fosszilis energiahordozó árak és az üzemanyagcella magas fajlagos költsége miatt azonban nem indultak átfogó fejlesztések ezen a területen. A tudományos ismeretek bővülése (anyagtudományi, mikrobiológiai, bioinformatikai, molekuláris biológiai, stb.), valamint számos új találmány (proton-szelektív membrán, grafit-szálas elektródok, nanotechnológias anyagok, stb.) lehetővé tették, hogy a mikrobiális üzemanyagcellák új, hatékonyabb formát ölthessenek. 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 töltnek 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.

2. Célkitűzések

Doktori kutatómunkám célja a mikrobiális üzemanyagcellák elektromos teljesítményének növelése a benne alkalmazott mikrobák és az egyes szerkezeti elemek fejlesztése révén.

Kutatásomban következő feladatokat tűztem ki:

- 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 és kolonizációs képességének, valamint redox-mediátorok termelésének és tápközeghez adásuk hatásának vizsgálata mikrobiális üzemanyagcellában való alkalmazásra.
- Elektromosan vezetőképes gél-anód konstrukció létrehozása és alkalmazása különböző üzemi (szakaszos, fél-folytonos és folytonos) mikrobiális üzemanyagcella-rendszerekben.
- Nem-nemesfém alapú lég-katód katalizátor konstrukció létrehozása és egykamrás mikrobiális üzemanyagcella-rendszerekben való alkalmazása.

3. Anyagok és módszerek

A munkámban alkalmazott mikroorganizmusok egy része (*Geobacter* és *Shewanella*) a Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (DSMZ) törzsgyűjteményből került beszerzésre. A *Saccharomyces cerevisiae* WS-120 törzs a Weihenstephan-i Egyetem élesztőgyűjteményéből származott (Hefebank Weihenstephan, TUM, Freising, Németország), míg a *Lactobacillus plantarum* 2142 törzset és az *Escherichia coli* ATCC 8739 törzset a Perugia-i Egyetem (Perugia, Olaszország) bocsájtotta rendelkezésemre.

A mikroba szaporodásának vizsgálatánál két módszert alkalmaztam a sejtszámok meghatározására: 600 nm-es fényhullámhosszon történő optikai denzitás mérést és lemezöntéses technikát.

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

A mikrobiális vas-redukció vizsgálatához a Fe^{3+} -ion koncentráció változását követtem nyomon. Az alkalmazott tápközegek 5 g/l-es koncentrációban vas(III)-citrátot tartalmazott. A Vas(III)-ionok mennyiségének változását ammónium-rodanidos (NH_4SCN) módszerrel határoztam meg (MSZ 318-14:1987).

Az extracelluláris mediátor képzés vizsgálatához a mikroba kultúrát 48 órán keresztül inkubáltam 30 °C-on aerob, anaerob és mikrobiális üzemanyagcella rendszerben. A sejtek elválasztására a tápközeget 10 percig 15 °C-on centrifugáltam 5500 g gyorsulással. A felülúszót 0,2 μm -es pórusméretű PTFE szűrővel szűrtem, és meghatároztam a szűrletben az extracelluláris elektron közvetítő tulajdonságú anyagok mennyiségét (fehérje- és flavintartalom).

A mikrobák tapadási vizsgálatánál egy 6-lyukú mikrolemez zsebeibe egy-egy darab vizsgálandó mintát helyeztem, majd 4,5 ml tápközeggel töltöttem meg. Ezt követően 500 μl , legalább 10^7 TKE/ml sejtsűrűségű, 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 megtapadt sejteket 1 ml 96%-os etanollal rögzítettem, majd átmostam 0,5 M-os Sörensen foszfát pufferrel. Ezt követően 2 percig 1 ml 0,41 m/V%-os etanolos kristály ibolya festék oldattal festettem. Azután újra átmostam több alkalommal a 0,5 M-os Sörensen foszfát

pufferrel. A következő lépésben 1 ml 96%-os etanollal leoldottam a rögzült sejteket, majd megmértem az abszorbanciáját 595 nm fénycsőhosszon.

A gél-anódok 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. A nano-kompozit szerkezet kialakításához titán-dioxidot és ammónium-perszulfátot használtam, majd ismét ultrahangos kezelést hajtottam végre 2 órán keresztül -10 °C-on. A nano-kompozit végső kialakításakor különböző koncentrációban grafit port (0-0,05 g/ml) adtam az elegyhez, valamint megfelelő mennyiségű 10^7 TKE/ml elektrogén baktérium kultúrát (*Shewanella algae*), majd az elegyet 10 mM kalcium-klorid oldatba csepegtettem.

Rézhalóra galvanizálás segítségével nikkelt bevonatot készítettem. A bevonni kívánt hálót 90 °C-os 0,6 M-os Na_3PO_4 és 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 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.

Kutatásomban a „szendvics”-forma kétkamrás mikrobiális üzemanyagcellát alkalmaztam, amelyben a két teret Nafion 117 proton-szelektív membrán választotta el. A cella össztérfogata 24 cm^3 . A mérési beállításnak megfelelően különböző anyagokat (grafit szálakból szőtt grafit lap, acél- vagy alumínium lemez stb.) használtam elektródként. Az anódtérbe tápközeget és mikrobákat juttattam 10^6 - 10^7 TKE/ml beoltási sejt mennyiségben, vagy gélbe zárt mikrobákkal. A katódtérben oxidálószerként 0,1 M-os kálium-hexaferrocianát oldatot használtam 0,5 M-os Sørensen foszfát pufferben (pH=7) oldva. A beoltást követően az üzemanyagcellát a mérőműszerre kötöttem, amely számítógéphez csatlakozott. Az üzemanyagcellában keletkező elektromos feszültséget multiméterrel mértem. A mérés során a mikrobiális üzemanyagcellához 100-1000 Ω változtatható ellenállást kötöttem, így a kapott feszültség értékekből Ohm-törvénye alapján számolhattam az áramerőséget. A mikrobiális üzemanyagcella légkatód fejlesztési kísérleteihez egykamrás szakaszos üzemű, mediátor nélküli mikrobiális üzemanyagcellát alkalmaztam.

A riboflavin tartalom meghatározására fotometriás módszert alkalmaztam (European Pharmacopoeia 01/2008:0292).

A minták fehérjetartalmának meghatározásához módosított Bradford módszert alkalmaztam.

A mintákban lévő fehérjék vezetőképességének mérésére egy két-elektrodos ellenállásmérő cellát hoztam létre. Az ellenállás meghatározásához a cella elektródjai közé fehérje oldatot injektáltam és elektromos áramot vezettem rajta keresztül. Ohm törvénye

alapján számoltam az ellenállást, majd az ellenállás reciproka adta a fehérje oldat vezetőképességét.

4. Az eredmények összefoglalása

4.1 Mikrobák alkalmazhatósági vizsgálata a MÜC bio-katalizátoraként

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/m^2), x: 460 nm-en mért abszorbancia változása, y: beoltási sejtszám logaritmus (TKE/ml).

Továbbá 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 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/m^2), x: 460 nm-en mért abszorbancia változása.

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. Megállapítottam, hogy az általam kidolgozott modellek alkalmazásával a mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramerőssége megfelelően prediktálható.

4.2 Mikroorganizmusok elektrogén profiljának meghatározása

Megállapítottam két kevésbé ismert mikrobafaj elektromos áramtermelési tulajdonságát. A *Geobacter toluenoxydans* 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 Fe^{3+} -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: $\mu^P_{\max} = 0,123$ mg Fe^{3+} /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. toluenoxydans* 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 sejttömeg jelentősen befolyásolta a *G. toluenoxydans* 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 és kolonizációs képességét különböző természetű felületen (polisztirol, alumínium, acél, grafit). Megállapítottam, hogy a mikroba képes megtapadni az általam vizsgált felületeken. A legnagyobb megtapadt sejttömeg a szális 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 vezetőképés 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 vezetőképessége ($0,0267$ mS/ 10^7 TKE) is jelentősen meghaladta az aerob minták elektromos vezetőképességét ($0,0172$ mS/ 10^7 TKE). Anaerob mintáknál szignifikánsan nagyobb mennyiségű flavintartalmat ($8,38 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/10^7$ TKE) mértem a fermentáléban, 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.

4.3. Elektrodok fejlesztése a MÜC teljesítmény növelésére

Mikrobiális üzemanyagcella konstrukció fejlesztését is elvégeztem, mind az anód mind a katód esetében. A vezetőképés gél létrehozásához alginát-polianilin kopolimert és grafitport használtam. Megállapítottam, hogy $0,01$ g/ml koncentrációjú anilin hozzáadása 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). 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. 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 üzemű 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 alaputatások, de megítélésem szerint hozzájárulnak a mikrobiális üzemanyagcella technológia fejlesztéséhez.

5. Új tudományos eredmények

1. Új, vas-redukción alapuló mikroba-szelektáló fotometriás módszer 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 10⁶ TKE/ml beoltási sejtkoncentrációt alkalmazunk (SZÖLLŐSI *et al.*, 2015b).
2. Feltártam a *Geobacter toluenoxydans* DSMZ 19350 törzs szaporodás-kinetikai és elektromos áramtermelésének összefüggéseit 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 Fe³⁺-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 sejttömeg 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 és kolonizációs képességeit, valamint az extracelluláris, vezetőképessé 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, de a legnagyobb sejttömeg a szálas 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-elektrodót hoztam létre, ahol polianilin-alginát-titán-dioxid-grafit gélbe rögzítettem az alkalmazott mikroba sejteket. Az új anóddal olyan MÜC konstrukciót hoztam létre, amely képes megnövelt hatékonysággal különböző módban 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 rézelektrodót, amely légkatódként funkcionálhat. Segítségével egykamrás, működő MÜC konstrukciók alakíthatók ki, amelyek bár kisebb teljesítményűek, de kisebb költségekkel megvalósíthatók.

6. Következtetések és javaslatok

A mikrobiális üzemanyagcella technológia egyik meghatározó tényezője a benne alkalmazott mikrobakultúrák, amely felelős a tápanyagokban kötött kémiai energia közvetlenül 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 vezetőképes fehérjék és a redox

mediátorok termelésének vizsgálata során szerzett ismeretek megfelelően hasznosíthatók a *G. toluenoxydans* és *S. xiamenensis* fajok különböző célú (szennyvíztisztítási vagy energiatermelési) és kialakítású MÜC-rendszerekben való alkalmazásánál. Ezen információk nélkülözhetetlenek az esetleges további törzsfélesztésekhez, 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 a nagy mennyiségű keményítőt tartalmazó szennyvizek (pl. a söripari, keményítőipari vagy akár papíripari szennyvizek) ártalmatlanítására.

Az elektromosan vezetőképes gél-anód konstrukció az eddig általánosan alkalmazott lap elektródokhoz képest jobb helykihasználást biztosíthat, mivel nagy fajlagos felülettel rendelkezik, megnövelheti az üzemanyagcella teljesítményét. A gél-mátrix megfelelő védelmet nyújthat a befertőződéssel szemben is, így létrehozhatók nem steril körülmények között is monokultúrák mikrobiális üzemanyagcella rendszerek. A gél-anódok megfelelően teljesítettek a különböző üzemeltetési módokban, így megfelelő alapot szolgálhatnak a léptéknöveléshez, amely akár az 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 a más tudományágak számára, mint a diagnosztika, energetika vagy akár az úrkutatás számára.

7. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Impakt faktoros folyóiratcikk

Szöllősi A., Hoschke Á., Rezessy-Szabó J., Nguyen Q.D. (2015). Novel method for screening microbes for application in microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 179, 123-127, (IF: 5,039 2013)

Szöllősi A., Narr L., Kovács A.G., Styevkó G. (2015). Relationship between kinetics of growth and production of exo-electrons: case study with *Geobacter toluenoxydans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62 (3) 101-110, (IF: 0,780 2013)

Konferencia kiadványban megjelent teljes terjedelmű közlemény

Szöllősi A., Bárány N., Hoschke Á., Rezessy-Szabó J., Nguyen Q.D. (2013). Effects of different substrates on growth of *Shewanella xiamenensis*. *Food Science Conference*, Budapest, Proceedings, 265-268.

Könyvfejezet

Nguyen Duc Quang, **Szöllősi Attila**, Rezessyné Szabó Judit, Bujna Erika, Kun Szilárd, Hoschke Ágoston (Inpress): Mikrobák a mikrobiális üzemanyagcellákban. In: Mikrobiális üzemanyagcellák, Ed: Bélafiné Dr. Bakó Katalin. Pannon Egyetem Kiadó, 3. fejezet

Konferencia kiadványban megjelent összefoglalók

Magyar nyelvű

Szöllősi A., Hoschke Á., Rezessy-Szabó J., Nguyen Q.D. (2013) Mikrobiális energiacella vizsgálata. 350. *Tudományos kollokvium*, Budapest

Szöllősi A., Nguyen Q.D. (2014) Mikrobiális üzemanyagcella fejlesztési lehetőségei. *XX. nemzetközi környezetvédelmi és vidékfejlesztési diákkonferencia*, Szolnok

Idegen nyelvű

Szöllősi A., Baranyai L., Kun Sz., Hoschke Á., Rezessy-Szabó J., Nguyen Q.D. (2012) Effect of sodium acetate on production of exo-electrons by *Geobacter sulfurreducens* DSMZ 12127 strain. *Conference of Chemical Engineering '12*, (181. o.), Veszprém

Szöllősi A., Hoschke Á., Rezessy-Szabó J., Nguyen Q.D. (2013) Fast method for detection of exoelectron-production of microorganisms. *Conference of Chemical Engineering '13*, (58. o.), Veszprém

Szöllősi A., Narr L., Hoschke Á., Rezessy-Szabó J., Nguyen Q.D. (2014) Effects of sodium-acetate on growth, reduction of Fe³⁺ and production of exoelectrons of *Geobacter toluenoxydans*. *Conference of Chemical Engineering '14*, (170. o.), Veszprém

Szöllősi A., Hoschke Á., Rezessy-Szabó J., Nguyen Q.D. (2013). Electricity generation by single-chamber microbial fuel cell using nickel on air-cathode. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* (92. o.)

Szöllősi A., Hoschke Á., Rezessy-Szabó J., Nguyen Q.D. (2013) Enhancement of performance of microbial fuel cells using a new gel-type anode and semi-continuous fermentation. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, (245.o.)

Szöllősi A., Nguyen Q.D. (2014) Growth and Fe(III)-reduction of *Shewanella xiamenensis* on some carbohydrates. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése*, Absztraktfüzet, Keszthely