

УДК 577.352.5.628.163

І.А. Самаруха, Ю.С. Білім, О.А. Михайленко

СПОСОБИ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ МІКРООРГАНІЗМІВ З ЕКЗОЕЛЕКТРОГЕННОЮ АКТИВНІСТЮ

The development and enhancement of bioelectrochemical systems to produce electricity and hydrogen is a promising area of modern bioenergy. Microorganisms are the active component of bioelectrochemical process in bioelectrochemical systems. These microorganisms further the processes of degradation of energy substrate to form compounds and exocell transfer of electrons to a terminal acceptor. We analyze existing methods of biofilm formation of electroactive microorganisms depending on its species diversity and processes of formation. By applying the methods of analysis, synthesis and comparative evaluation, we show that the methods of two-step selection and consistent enrichment of the biofilm of electroactive bacteria are the most promising. Also, they do not require sophisticated equipment and procedures for implementing the process. We analyze the formation of molecular genetic biofilm and describe the dynamics of the process for the biofilm bacteria *Geobacter sulfurreducens*.

Вступ

Розроблення та вдосконалення нових способів одержання енергії й енергоносіїв за допомогою живих організмів, їх ферментних систем і продуктів життєдіяльності із комплексної сировини природного, штучного та синтетичного походження є провідним завданням у розвитку біоенергетики [1]. Значний біоенергетичний потенціал мають біоелектрохімічні системи (БЕС), за допомогою яких можливе продукування електричної енергії, водню та інших високоенергетичних носіїв, забезпечення процесу біоелектрохімічного опріснення води й опосередкованого перетворення сонячної енергії [2].

Мікробний паливний елемент є одним із видів БЕС, в якому процес перетворення енергії хімічних зв'язків комплексних високомолекулярних субстратів (стічні води, лігноцелюлоза тощо) у електричну енергію реалізується за допомогою цілих живих клітин мікроорганізмів з екзоелектрогенною та деструктивною здатністю, які зазвичай іммобілізовані на поверхні електрода [3]. Електрохімічно активна біоплівка складається з мікроорганізмів, здатних до позаклітинного перенесення електронів, та є складною тривимірною структурою, в якій мікроорганізми ростуть у матриці з позаклітинних полімерних речовин, які вони виробляють [4]. Такі біоплівки беруть участь у дисимільятивному відновленні оксидів металів у природних середовищах, а також в електрохімічних процесах на електродах мікробних БЕС [5, 6].

У літературних джерелах дослідники наводять різні способи формування та збагачення біоплівки екзоелектрогенів [7]. Так, джерела інокуляту, умови селекціонування, конструкція інокулятора та термінальні акцептори елек-

тронів – визначальні фактори у проведенні селекції та збагаченні електроактивної біоплівки. В літературі наведено експериментальні дані щодо впливу окремих факторів на процес формування біоплівки [8], використання різних процедур селекції та збагачення біоплівки електроактивними мікроорганізмами [9, 10], проте, порівняння процедур селекції ще не було проведено.

Постановка задачі

Мета роботи – теоретичне порівняння способів формування анодної біоплівки мікроорганізмами з екзоелектрогенною активністю. Така біоплівка може бути сформована з чистої культури мікроорганізмів з екзоелектрогенною та деструктивною активністю чи бінарної культури деструкторів та електрогенів, виділена у вигляді асоціації, шляхом селекції мікроорганізмів з різних природних чи штучних джерел, створена через збагачення асоціації мікроорганізмів-деструкторів екзоелектрогенами.

Формування біоплівки з монокультури мікроорганізмів з екзоелектрогенною та деструктивною активностями

Використання чистої культури мікроорганізмів при формуванні біоплівки в БЕС є одним із найбільш вивчених напрямів, оскільки дає змогу детально дослідити процес біоелектрогенезу, оцінити втрати й оптимізувати конструкцію мікробного паливного елемента (МПЕ), а також може знайти застосування у біосенсорах [11] та мікроМПЕ [10]. Донині продукування електричного струму спостерігалось у чотирьох з п'яти класів протеобактерій,

а також у *Firmicutes* і *Acidobacteria phyla*. Дріжджі *Anomala pichia* виявили наявність окисно-відновних ферментів на зовнішній мембрані. Також проявили здатність продукувати струм у МПЕ й аеробні фототрофні ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, в яких була виявлена здатність до виробництва електропровідних приладків, що називаються нанопроводами [12]. Проте мікроорганізми, які, як відомо, не потребують додавання екзогенних медіаторів і здатні повністю окислювати органічний субстрат у вуглекислий газ із майже кількісним прямим перенесенням електронів на електрод, належать до *Geobacteraceae* (видів *Desulfuromonas*, *Geopsychrobacter* і *Geobacter*), *Rhodoferax ferrireducens* і *Geothrix fermentans* [11, 13–16]. Механізми перенесення електрона в *Geobacteraceae* становлять особливий інтерес, тому що: 1) вони є домінуючими мікроорганізмами, що природно колонізують електроди та продукують електроенергію з анаеробних субстратів, таких як осади з низькою мінералізацією [11, 17, 18] і відходи тваринництва [19]; 2) можуть окислювати різні органічні сполуки до вуглекислого газу, використовуючи електроди, які слугують єдиним акцептором електронів [11–13, 15]; 3) повністю досліджено послідовність генома [20] та генетичні системи [21] *Geobacter sulfurreducens*, що дає можливість систематично оцінювати механізми для виробництва електроенергії і штучно створювати штами з підвищеною екзоелектрогенною здатністю [22].

G. sulfurreducens має 111 різних генів, які кодують цитохром *c*, що більше ніж у будь-якому іншому організмі [23, 24]. Більшість білкових продуктів цих генів перебувають у периплазматичному просторі та зовнішній мембрані клітини, де вони відіграють важливу роль у ланцюзі перенесення електронів [23, 25–27]. Найважливішими генами, що кодують цитохром *c*, є *OmcB*, *OmcE*, *OmcS* і *OmcZ* [28]. Штами *G. sulfurreducens*, що містять делеції в будь-якому з цих генів, особливо в гені *OmcZ*, виявляють нижчу активність електрон-транспортного ланцюга та зниження виробництва електроенергії порівняно зі штамми дикого типу (таблиця) [28, 29]. Це доводить, що експресія генів, які кодують цитохром *c*, має важливе значення для транспорту електронів до позаклітинних акцепторів, бо мутантні штами з видаленими генами втрачають здатність виробляти високу питому густину струму в МПЕ, а після повторного введення гену значення питомої густини струму, що продукується, зростають.

Таблиця. Виробництво струму в МПЕ, інокульованому *G. sulfurreducens* (дикий тип, штам зі штучною делецією генів, штам з комплементарією видаленого гена шляхом експресії гену на плазміді) та значення генів *pilA*, *OmcZ*, *OmcB*, *OmcE*, *OmcS*, *GSU1497* (модифіковано [28])

Генетичні маніпуляції	Максимум виробленого струму, мА
Дикий тип	14,42 ± 0,62
<i>pilA</i> делеція	1,20 ± 0,44
<i>pilA</i> комплементарний	14,12 ± 0,14
<i>OmcZ</i> делеція	1,3 ± 0,36
<i>OmcZ</i> комплементарний	13,44 ± 0,36
<i>OmcB</i> делеція	12,41 ± 0,63
<i>OmcE</i> делеція	12,75 ± 0,41
<i>OmcS</i> делеція	12,67 ± 0,57
<i>GSU1497</i> делеція	8,01 ± 0,42

Особливістю *G. sulfurreducens* є його здатність до утворення товстої біоплівки на поверхні акцептора електронів (в МПЕ товщина біоплівки сягає понад 50 мкм) [26]. Формування біоплівок можливе завдяки наявності зовнішніх мембранних структур – пілей, які у *G. Sulfurreducens* кодуються геном *pilA* [26, 30]. Дикий тип клітин, які експресують ген *pilA*, здатний формувати біоплівку практично на будь-якій поверхні, тоді як мутанти з делецією гену *pilA* можуть іммобілізуватись на поверхнях лише шляхом адгезії, але не утворюють товстої біоплівки [26, 30]. Дикий тип *G. sulfurreducens* в МПЕ генерує набагато більше електроенергії, ніж штами з делецією гену *pilA* [26]. Є різні пояснення того, чому штами, що формують біоплівку, продукують більшу кількість електричної енергії МПЕ.

Пілі – мікробні нанопроводи. Електрони, які утворюються всередині клітини при метаболізмі ацетату, транспортуються на цитохром *c* зовнішньої мембрани і через пілі переносяться на анод [25, 26, 31]. Для клітин, які перебувають на зовнішній поверхні товстої біоплівки, пілі слугують нанодротоми, через які електрони передаються від клітини до клітини, а потім на анод [27, 32]. Це означає, що всі клітини біоплівки віддають електрони, що веде до підвищення виробництва струму [26].

Цитохром *c*-переносники. Існує припущення, що цитохром *c* може взаємодіяти з білками інших клітин і електрони можуть передаватися від однієї клітини до іншої. Якщо поруч із клітиною немає електронного акцептора, цитохром *c* виступає як електронний накопичувач [24, 27].

Електронпровідні комплекси "пілін-цитохром". Електрони з поверхні мембрани клітин на електрод передаються за допомогою комплексів, утворених з піліну та пілін-асоційованих цитохромів (рисунок).

Незважаючи на загальне уявлення про те, як у *G. sulfurreducens* проходить процес передачі електронів до позаклітинних акцепторів електронів, необхідно додатково провести дослідження, перш ніж створювати генетично модифіковані штами. В теорії можуть бути сконструйовані штами з вищою експресією генів *piA*, *OmcZ*, *OmcB*, *OmcE* і *OmcS*. У результаті модифіковані мікроорганізми могли б продукувати більше пілей, що дасть можливість формувати біоплівки більшої товщини і більше нанопроводів для передачі електронів [33], а також виробляти більше цитохромів *c*, що сприятиме перенесенню електронів до поверхні анода [23, 34].

Для реалізації процесу формування біоплівки *G. sulfurreducens* необхідно провести культивування при 30 °С у строго анаеробних умовах. Посів та інкубацію на твердих середовищах здійснюють в анаеробній камері, в атмосфері суміші газів (7 % H₂, 10 % CO₂, 83 % N₂) при температурі 30 °С. Штами *G. Sulfurreducens* культивуються в двох типах середовищ: NBAF з додаванням 0,1 % дріжджового екстракту та цистеїну (NBAFYE). NBAF – модифіковане середовище [34], яке містить 15 мМ ацетату як донора електронів і 40 мМ фумарату як акцептора електронів. Склад середовища: 0,42 г/л

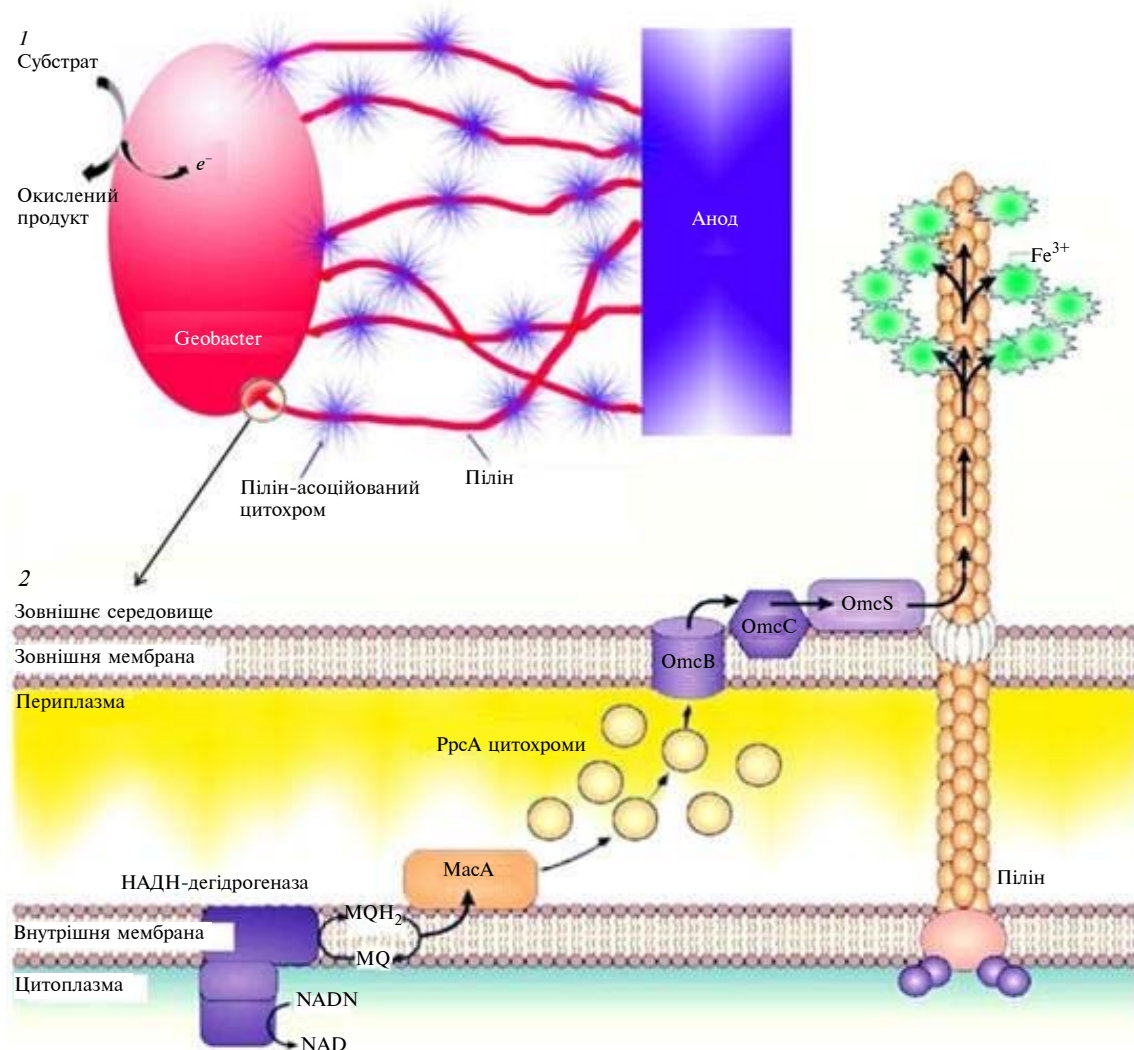


Схема передачі електронів у клітинах *Geobacter*. 1 – пряме перенесення електронів за допомогою пілей та асоційованих цитохромів; 2 – потенційний шлях перенесення електронів на Fe³⁺ у *G. sulfurreducens*: МасА, РрсА, ОмсВ, ОмсС і ОмсЕ – цитохроми типу *c*; MQH₂ – менахінол; MQ – менахінон

KH_2PO_4 , 0,22 г/л K_2HPO_4 , 0,2 г/л NH_4Cl , 0,38 г/л KCl , 0,36 г/л NaCl , 0,04 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,8 г/л NaHCO_3 , 0,5 г/л Na_2CO_3 , 2,04 г/л $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 6,4 г/л $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, 0,5 мл/л 0,1 % резазурину, 1,0 мл/л 100 мМ Na_2SeO_4 , 10,0 мл розчину вітамінів [35] і 10,0 мл розчину мікроелементів NB. Склад розчину мікроелементів NB: 2,14 г/л поліамінокарбонної кислоти ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6$), 0,1 г/л $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,3 г/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,17 г/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2 г/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 г/л $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,005 г/л $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,005 г/л H_3BO_3 , 0,09 г/л Na_2MoO_4 , 0,11 г/л $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ і 0,2 г/л $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Середовище перед використанням продувається з газовою сумішшю (80 % N_2 , 20 % CO_2) для видалення розчиненого кисню і отримання $\text{pH} \approx 6,7$.

Матеріали, які використовують для анода, мають великий вплив на ефективність екзоелектрогенезу *G. sulfurreducens*. Графіт, який є найбільш розповсюдженим анодом в МПЕ [23], має розвинену поверхню, яка забезпечує велику площу поверхні для іммобілізації клітин. У МПЕ з *G. sulfurreducens* графіт є не тільки поверхнею для іммобілізації окремих клітин безпосередньо на аноді, а й дає змогу приєднуватися до поверхні за допомогою пілей. При цьому біоплівка, що формується, міцно зв'язана з анодом і не руйнується за умов інтенсивного масообміну [27]. Інші анодні матеріали також були протестовані в МПЕ з *Geobacter*. Золото вважається відмінним матеріалом для виготовлення анодів, бо має високу провідність і стійкість до окислення. Тим не менш, експерименти, проведені із золотими анодами, показали, що питома потужність МПЕ значно нижча, ніж у випадку використання МПЕ з графітовими електродами. Це пояснюється тим, що золоті аноди мають рівні поверхні, тому біоплівка не закріплюється на аноді і перебуває в товщі розчину [27]. Однак експерименти також засвідчили можливість використання золотих анодів у мікроМПЕ [25, 27], тоді як застосування графітового анода в наномасштабі є проблематичним.

При математичному описі процесу формування біоплівки варто зауважити, що, на відміну від об'єму рідини, біоплівка характеризується просторовими градієнтами концентрації і для розчинених речовин $S_f(x, y, z)$, і для компонентів біомаси $X_f(x, y, z)$. Крім того, ці концентрації також залежать від часу, так як біо-

плівка постійно розвивається з плином часу. Рівняння моделі біоплівки детально викладені в публікаціях К. Піціореану та Ж. Ксав'є [36, 37], а тут пропонуються тільки основні модифікації цих моделей для розрахунку матеріального балансу. Для будь-якого розчинного компонента матеріальний баланс може бути складений за умови, що транспорт здійснюється тільки шляхом молекулярної дифузії і розчинені речовини можуть бути вироблені або спожиті в декількох біотичних та абіотичних процесах трансформації з сумарною швидкістю $r_{S,F}$ і коефіцієнтом дифузії D :

$$\frac{\partial S_f}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial S_f}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(D \frac{\partial S_f}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(D \frac{\partial S_f}{\partial z} \right) + r_{S,F}. \quad (1)$$

Міграцією іонів у полі електричного потенціалу тут знехтували, вважаючи, що висока провідність середовища зробить градієнт потенціалу незначним. Рівняння (1) застосовується на прямокутній розрахунковій області, частково заповненій біоплівкою і приграничним шаром масообміну без біоплівки. Для 1D і 2D моделей можливі спрощення (d/dx та/або $d/dy = 0$). Граничні умови, необхідні для розв'язання рівняння матеріального балансу (1), відображають особливості утворення змодельованої системи біоплівки. За $z = L_z$ (у верхній частині розрахункової області біоплівки), де L_z – товщина біоплівки в координатах z , об'ємні концентрації всіх розчинних компонентів у біоплівці S_f дорівнюють концентрації компонентів в об'ємі рідини S_B . Поверхня електрода, на якій розвивається біоплівка (при $z = 0$) в цей момент, електрохімічно активна для окремих хімічних речовин (наприклад, медіаторів, протонів з $r_{S,E} \neq 0$), але інертна і непроникна для інших ($r_{S,E} = 0$). Загалом, граничні умови на поверхні електрода відображають той факт, що швидкість поверхневого продукування тієї чи іншої сполуки на поверхні електрода описується рівнянням

$$D \frac{\partial S_f}{\partial z} + r_{S,E} = 0. \quad (2)$$

Решта побічних систем пов'язані та формують так звану границю “періодичного” типу [37]. Системи “об'єм рідини–приграничний шар” і “приграничний шар–біоплівка” розглядаються як внутрішні міжфазні границі, де є

умови безперервної подачі субстрату. Початковий стан (при $t=0$) передбачає рівномірний розподіл концентрації у всій області, з $S_F = S_B$. Рішення матеріального балансу розчинених речовин біоплівки, $S_F(x, y, z)$ на конкретний момент часу, використовується для розрахунку:

- загальної швидкості реакцій в біоплівці, необхідної для матеріального балансу об'єму рідини;
- швидкості реакції на електроді та струмів, оскільки $S_E = S_F(x, y, 0)$;
- швидкості зростання біомаси біоплівки.

Моделі для утворення/споживання біомаси і транспорту в межах біоплівки базуються на моделюванні, заснованому на підходах, описаних у [37]. Значущі параметри: початкова кількість біомаси n_{p0} , щільність біомаси d_x , початкова маса частинок біомаси m_0 і критичне значення біомаси для утворення біомаси поділом частинок $m_{x,max}$.

Формування біоплівки асоціацією мікроорганізмів з екзоелектрогенною активністю

У більшості сучасних МПЕ використовуються змішані бактеріальні культури, як правило, взяті з природного середовища – ґрунту або анаеробного активного мулу зі станцій очищення стічних вод. Такі асоціації мікроорганізмів є доступними, стабільними, з широким різноманіттям анодофільних мікроорганізмів, не маючи домінуючих видів, і володіють значною деструктивною здатністю до широкого кола субстратів – починаючи від простих органічних кислот [22], вуглеводів (у т.ч. складних вуглеводів, таких як крохмаль, целюлоза [38, 39]), білків [40], закінчуючи широким спектром поліароматичних субстратів. Живі бактерії в анодній комірці перебувають у двох станах: вільно плавають в об'ємі електроліту [41] або прикріплені до поверхні анода у вигляді мікробної біоплівки. Порядок утворення біоплівки дуже простий: інертний електрод (наприклад, вуглець) занурюється за анаеробних умов у розчин субстрату, в який засівається інокулят (наприклад, стічна вода), і до нього прикладається незначний позитивний потенціал (0,2 В відносно Ag/AgCl) [42]. Як наслідок, формується електроактивна біоплівка, яка складається з мікробної асоціації, що спроможна використовувати електрод як термінальний акцептор електронів. Однак, як правило, така первинна біоплівка має низьку біоелектрокаталітичну активність [43], тому що в первинному інокуляті кількість електроактивних бакте-

рій низька порівняно з кількістю "нормальних", електрохімічно неактивних бактерій. Хоча наявність електрода (і штучно створеної різниці потенціалів) є фактором селективного тиску для виділення електрохімічно активних бактерій, первинна біоплівка в основному складається з електрохімічно інертних мікроорганізмів. Для вирішення цієї проблеми зазвичай використовується складна і трудомістка процедура збагачення, яка складається з ітераційного механічного видалення біоплівки з електрода, повторної інокуляції і подальшого переформування біоплівки [44–45]. У зв'язку з чутливістю електрохімічно активних бактерій до кисню, всі ці кроки мають бути виконані в безкисневих умовах, що складно, особливо для неспеціалістів (потенційних майбутніх користувачів технології МПЕ).

Існує альтернатива такій трудомісткій процедурі селекції, в якій порядок селекції і акліматизації біоплівки може бути спрощений за допомогою послідовної електрохімічної селекції, за якої на електроді з первинною біоплівкою відбувається приріст електроактивних мікроорганізмів. Було доведено, що вторинне утворення біоплівки є швидким процесом, який займає кілька діб, тоді як первинне утворення біоплівки звичайно триває принаймні два тижні і потребує неодноразової повторної інокуляції. Вольтамперометричні характеристики вторинної біоплівки показують, що вона переважно складається з *G. sulfurreducens* (або близьких родів), тобто має значну частку електрохімічно активних видів бактерій у складі змішаної культури біоплівки.

Середовище для такої модифікованої процедури селекції має склад: 0,31 г/л NH_4Cl , 0,13 г/л KCl , 2,69 г/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4,33 г/л Na_2HPO_4 і розчин мікроелементів (12,5 мл) та вітамінів (12,5 мл) [29]. Ацетат (10 мМ) слугує як субстрат (донор електронів). Усі розчини стерилізують в автоклаві та доводять рН = 6,8. Перед посівом стерилізовані розчини субстрату продувають азотом протягом 20 хв для видалення кисню. Для формування і акліматизації біоплівки екзоелектрогенів використовують побутові та промислові стічні води, активний мул, відібраний з очисних споруд [42]. Для формування первинної біоплівки стічну воду вносять у герметичну електрохімічну комірку з розчином субстрату, що перемішується, у співвідношенні 1:30. Постійний потенціал 0,2 В прикладається до робочого електрода для полегшення формування біоплівки. Воно контролюється шляхом вимірювання струму біоелектро-

каталітичного окислення, а зміна субстрату в часі аналізується з використанням високоефективної рідинної хроматографії. При первинній селекції, як правило, необхідно вносити первинний інокулят (стічну воду) чотири рази для колонізації електродів і утворення біоплівки за умов регулярного внесення субстрату.

Для формування вторинної біоплівки електроди з первинною біоплівкою разом з одним або кількома чистими графітовими електродами занурюють у стерильний розчин субстрату з невисокою інтенсивністю масообміну. На електродах за допомогою потенціостата формується потенціал 0,2 В, а вторинна біоплівка – в періодичних умовах з регулярним поповненням розчину субстрату.

Збагачення біоплівки екзоелектрогенів

Такі джерела мікроорганізмів, як стічні води, активний мул і осади часто використовуються як посівний матеріал для МПЕ. Аналіз анодної біоплівки виявив велике бактеріальне різноманіття анодної асоціації, яке, однак, не є тенденційним до виокремлення домінуючих видів через значну кількість неактивних мікроорганізмів [46]. Проте цінні характеристики анодної асоціації, такі як деструктивна здатність, стабільність до впливу екзогенних факторів, зберігаються в МПЕ навіть під час збагачення біоплівки. Оскільки багато з екзоелектрогенів, виявлених у МПЕ, є металредуючими бактеріями (МРБ) [47], було розроблено експрес-метод виділення асоціації екзоелектрогенів (АЕ) із використанням слабозрочинного оксиду Fe (III) для культивування МРБ [48].

Модифіковане базове фосфатно-буферне середовище використовується для селекції культури Fe(III)-редуючих екзоелектрогенів [49]. Склад середовища: 0,45 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,9 г/л NaCl, 0,18 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г/л NH_4Cl , 1,5 г/л KH_2PO_4 , 2,19 г/л K_2HPO_4 , розчини мікроелементів (9 мл) і вітамінів (5 мл). Рівень pH доводили до 6,8–7,0 за допомогою NaOH або HCl. Ацетат (10 мМ) і оксид Fe (III) (100 мМ) [49] додаються як електронний донор і акцептор електронів відповідно, розчини яких готують і стерилізують окремо перед додаванням в основне середовище. Біоплівки з

анода МПЕ використовують як посівний матеріал для процедури збагачення МРБ. Частину анодного матеріалу (10 cm^2) МПЕ переносять у скляну пляшку, яка містить 80 мл фосфатного буфера (50 мМ, pH 7,0) і скляні кульки. Пляшку активно збовтують для утворення клітинної суспензії з біоплівки. Після вимірювання концентрації клітин ($5 \cdot 10^9$ кл/мл), суспензію вносять у 50 мМ фосфатного буфера (з розбавленням від 10^{-1} до 10^{-9}) та вводять у флакони, що містять Fe(III)-ацетатне середовище (60 мл). Пляшки інкубують при 28 °С.

Метод послідовного суспендованого збагачення стабільної асоціації екзоелектрогенів з використанням оксиду Fe(III), внаслідок експериментів на МПЕ, дає значно вищу потужність в умовах максимального виробництва енергії порівняно з вихідним посівним матеріалом та інокулятом з активного мулу. Створена АЕ має коротшу лаг-фазу у процесі продукування електричної енергії і вищу ефективність перенесення електронів (продуктивність Фарадея), ніж вихідна біоплівка або активний мул інокуляту. АЕ невимоглива у зберіганні і може використовуватись як посівний матеріал.

Висновки

В огляді наведено способи й описано передумови формування біоплівки мікроорганізмів з екзоелектрогенною активністю. Так, для систематизації було запропоновано класифікацію способів формування біоплівки за електроактивною складовою частиною: з монокультури мікроорганізмів; з асоціації мікроорганізмів; способами збагачення асоціації біоплівки. У статті показано, що найбільш перспективними є дві останні групи способів через можливість ширшого застосування таких біоплівок, їх стійкість до впливу екзогенних факторів (доступ до субстрату й електрода, інтенсивність масообміну, доступ кисню) та нескладну процедуру формування біоплівки.

Наведений аналіз способів формування біоплівки мікроорганізмів з екзоелектроактивною здатністю є основою у розробленні технології біоелектрохімічного продукування електричної енергії за допомогою мікроорганізмів на етапі підготовки інокулята та в пускових умовах функціонування.

2. Ye. Kuzminskiy, K. Shchurska, I. Samarukha, G. Lagód, "Different types of energy conversion for biohydrogen production", *Soc. of Ecological Chem. and Eng. (SEChE), "Proc. of ECOpole"*, vol. 5, no. 2, pp. 389–394, 2011.
3. Самаруха І.А., Кузьмінський Є.В., Щурська К.О. Дослідження процесу безмедіаторного біоелектрогенезу асоціацією анаеробних мікроорганізмів. Електрохімічні показники // *Вопросы химии и хим. технол.* – 2011. – № 4(2). – С. 163–165.
4. From 1st- to 2nd-Generation Biofuel Technologies - Full Report- An Overview of Current Industry and RD&D Activities, 2008, 128 с.
5. Щурська К.О., Самаруха І.А., Кузьмінський Є.В. Біоелектрохімічне генерування водню в мікробному паливному елементі. 2. Теоретична частина // *Відновлювальна енергетика.* – 2011. – № 3. – С. 83–93.
6. B. Virdis, F. Harnisch, D.J. Batstone, K. Rabaey and B. Donose, "Non-invasive characterization of electrochemically active microbial biofilms using confocal Raman microscopy", *Energy & Environmental Science*, vol. 5, no. 5, pp. 7017–7024, 2012.
7. Самаруха І.А., Голуб Н.Б., Кузьмінський Є.В. Використання мікроорганізмів для генерування електрики в електрохімічних енергоперетворюючих пристроях // *Наук. вісн. Чернів. ун-ту. Хімія.* – 2008. – № 399-400. – С. 103–105.
8. Fang Qian, Zhen He, M.P. Thelen and Yat Li, "A microfluidic microbial fuel cell fabricated by soft lithography", *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 5836–5840, 2011.
9. Самаруха І.А., Щурська К.О. Підбір та оптимізація методів селекції електрофільних мікроорганізмів-деструкторів стічних вод – біологічних складових мікробного паливного елемента // *Конф. НТУУ "КПІ" "Біотехнологія 21 століття"* 23 квітня 2009 р. – С. 48.
10. Щурська К.О., Самаруха І.А. Двоступенева селекція анодної біоплівки в мікробному паливному елементі // *XIII Міжнар. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених "Екологія. Людина. Суспільство"*, Київ, 19–23 травня 2010. – С. 343–344.
11. D.R. Bond, D.E. Holmes, L.M. Tender and D.R. Lovley, "Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments", *Science*, vol. 295, pp. 483–485, 2002.
12. D.R. Lovley, M.J. Baedeker, D.J. Lonergan, I.M. Cozzarelli, E.J.P. Phillips & et al., "Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction", *Nature*, vol. 339, pp. 297–300, 1989.
13. D.R. Bond and D.R. Lovley, "Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, pp. 1548–1555, 2003.
14. S.K. Chaudhuri and D.R. Lovley, "Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells", *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 1229–1232, 2003.
15. D.E. Holmes, J.S. Nicoll, D.R. Bond and D.R. Lovley, "Potential role of a novel psychrotolerant *Geobacteraceae*, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by the marine sediment fuel cell", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, pp. 6023–6030, 2004.
16. D.R. Bond and D.R. Lovley, "Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, pp. 2186–2189, 2005.
17. L.M. Tender, C.E. Reimers, H.A. Stecher, D.E. Holmes, D.R. Bond, D.A. Lowy et al., "Harnessing microbially generated power on the seafloor", *Nat. Biotechnol.*, vol. 20, pp. 821–825, 2002.
18. D.E. Holmes, D.R. Bond, R.A. O'Neil, C.E. Reimers, L.R. Tender and D.R. Lovley, "Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments", *Microb. Ecol.*, vol. 48, pp. 178–190, 2004.
19. K.B. Gregory, S.A. Sullivan and D.R. Lovley, "Electricity from swine waste coupled with odor reduction using electrodes", *Poster presentation at 105th American Soc. for Microbiol. General Meeting*, Atlanta, GA, USA, 2005.
20. M.V. Coppi, C. Leang, S.J. Sandler and D.R. Lovley, "Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, pp. 3180–3187, 2001.
21. D.E. Holmes, S.K. Chaudhuri, K.P. Nevin, T. Mehta, B.A. Methé, A. Liu, J.E. Ward, T.L. Woodard I, J. Webster and D.R. Lovley, "Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*", *Environ. Microbiol.*, vol. 8(10), pp. 1805–1815, 2006.
22. H. Liu, S. Cheng, B.E. Logan, "Production of electricity from acetate or butyrate in a single chamber microbial fuel cell", *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, pp. 658–662, 2005.
23. K.P. Nevin, B. Kim, R.H. Glaven, J.P. Johnson, T.L. Woodard, B.A. Methe, R.J. DiDonato, S.F. Covalla, A.E. Franks, A. Liu, D.R. Lovley, "Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells", *PLoS ONE*, vol. 4, no. 5, pp. 1–11, 2009.
24. G. Reguera, K.P. Nevin, J.S. Nicoll, S.F. Covalla, "Biofilm and Nanowire Production Leads to Increased Current in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 11, p. 7345–7348, 2006.
25. J.P. Busalmen, A. Esteve-Núñez, A. Berná, J.M. Feliu, "C-Type Cytochromes Wire Electricity-Producing Bacteria to Electrodes", *Angewandte Chemie*, vol. 47, pp. 4874–4877, 2008.
26. A. Esteve-Núñez, J. Sosnik, P. Visconti, D.R. Lovley, "Fluorescent properties of c-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens*", *Environ. Microbiol.*, vol. 10, pp. 497–505, 2008.

27. H. Richter, K. McCarthy, K.P. Nevin, "Electricity Generation by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Gold Electrodes", *Langmuir*, vol. 24, pp. 4376–4379, 2008.
28. K.J. Chae, M. Choi, J. Lee, K. Kim, I.S. Kim, "Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells", *Bioresour. Technol.*, vol. 100, pp. 3518–3525, 2009.
29. C. Dumas, R. Basseguy, A. Bergel, "DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*", *Electrochimica Acta*, vol. 53, pp. 3200–3209, 2008.
30. G. Reguera, K.D. McCarthy, T. Mehta, J.S. Nicoll, M.T. Tuominen, D.R. Lovley, "Extracellular electron transfer via microbial nanowires", *Nature*, vol. 435, pp. 1098–1101, 2005.
31. D.R. Lovley, "Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more", *Geobiology*, vol. 6, pp. 225–231, 2008.
32. G. Reguera, R.B. Pollina, J.S. Nicoll, D.R. Lovley, "Possible Nonconductive Role of *Geobacter sulfurreducens* Pilus Nanowires in Biofilm Formation", *J. Bacteriol.*, vol. 189, pp. 2125–2127, 2007.
33. H. Yi, K.P. Nevin, B. Kim, A.E. Franks, A. Klimes, L.M. Tender, D.R. Lovley, "Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells", *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, pp. 3498–3503, 2009.
34. D.R. Lovley, J.L. Fraga, J.D. Coates, E.L. Blunt-Harris, "Humics as an electron donor for anaerobic respiration", *Environ. Microbiol.*, vol. 1, pp. 89–98, 1999.
35. D.R. Lovley, R.C. Greening, J.G. Ferry, "Rapidly growing rumen methanogenic organism that synthesizes coenzyme M and has a high affinity for formate", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 48, pp. 81–87, 1984.
36. C. Picioreanu, J.-U. Krefl, M.C.M. van Loosdrecht, "Particle-based multidimensional multispecies biofilm model", *Appl. Environ. Microb.*, vol. 70 (5), pp. 3024–3040, 2004.
37. J.B. Xavier, C. Picioreanu, M.C.M. Van Loosdrecht, "A general description of detachment for multidimensional modelling of biofilms", *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 91 (6), pp. 651–669, 2005.
38. J. Nießen, F. Harnisch, M. Rosenbaum, U. Schröder, F. Scholz, "Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation", *Electrochem. Commun.*, vol. 8, pp. 869–873, 2006.
39. H. Rismani-Yazdi, A.D. Christy, B.A. Dehority, M. Morrison, Z. Yu, O.H. Tuovinen, "Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells", *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 97, pp. 1398–1407, 2007.
40. J. Heilmann, B.E. Logan, *Water Environ. Res.*, 2006, 78 p.
41. M. Rosenbaum, F. Zhao, U. Schröder, F. Scholz, "Interfacing Electrocatalysis and Biocatalysis with Tungsten Carbide: A High-Performance, Noble-Metal-Free Microbial Fuel Cell", *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 45, pp. 6658–6661, 2006.
42. B.H. Kim, H.S. Park, H.J. Kim, G.T. Kim, I.S. Chang, J. Lee, N.T. Phung, "Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 63, pp. 672–681, 2004.
43. K. Rabaey, G. Lissens, S.D. Siciliano, W. Verstraete, "A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency", *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, pp. 1531–1535, 2003.
44. B.E. Logan, *Microbial Fuel Cells*, John Wiley & Sons, 2008.
45. K.P. Nevin, H. Richter, S.F. Covalla, J.P. Johnson, T.L. Woodard, A.L. Orloff, H. Jia, M. Zhang, D.R. Lovley, "Power output and coulombic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells", *Environ. Microbiol.*, vol. 10, pp. 2505–2514, 2008.
46. A. Wang, D. Sun, N. Ren, C. Liu, W. Liu, B.E. Logan and W.-M. Wu, "A rapid selection strategy for an anodophilic consortium for microbial fuel cells", *Bioresour. Technol.*, vol. 101, pp. 5733–5735, 2010.
47. D.R. Nelson, J.G. Zeikus, "Rapid method for the radioisotopic analysis of gaseous end products of anaerobic metabolism", *Appl. Microbiol.*, vol. 28, pp. 258–261, 1974.
48. D.R. Lovley, E.J.P. Phillips, "Manganese inhibition of microbial iron reduction in anaerobic sediments", *Geomicrobiol.*, vol. 6, pp. 145–150, 1988.