



Politechnika Wrocławska

DZIEDZINA: NAUKI INŻYNIERYJNO-TECHNICZNE

DYSCYPLINA: INŻYNIERIA CHEMICZNA

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Bioelektrochemiczna stymulacja biodegradacji produktów ropopochodnych
w układach bioelektrochemicznych**

**Bioelectrochemical stimulation of biodegradation of petroleum compounds in
bioelectrochemical systems**

mgr inż. Bartosz Widera

Promotor główny:

dr hab. inż. Piotr Rutkowski, prof. PWr

Promotor pomocniczy:

dr hab. inż. Grzegorz Pasternak, prof. PWr

Słowa kluczowe: *biodegradacja, bioremediacja, układy bioelektrochemiczne, mikrobiologiczne ogniwa paliwowe, związki ropopochodne*

WROCŁAW 2024

Spis treści

I.	STRESZCZENIE.....	5
II.	ABSTRACT.....	8
III.	SPIS SKRÓTÓW I SYMBOLI	10
IV.	PRZEGLĄD LITERATUROWY.....	14
4.1	Zanieczyszczenia ropopochodne w środowisku	14
4.1.1	Źródła zanieczyszczeń ropopochodnych w środowisku	14
4.1.2	Klasyfikacja zanieczyszczeń ropopochodnych	14
4.1.2.1	Węglowodory alifatyczne	15
4.1.2.2	Węglowodory aromatyczne.....	16
4.1.2.3	Węglowodory heterocykliczne.....	16
4.1.3	Metody remediacji związków ropopochodnych w środowisku	17
4.1.3.1	Metody fizyczne	17
4.1.3.2	Metody chemiczne	17
4.1.3.3	Metody biologiczne.....	17
4.1.4	Czynniki wpływające na biodegradację związków ropopochodnych	20
4.1.5	Wyzwania związane z degradacją związków ropopochodnych	22
4.2	Biosurfaktanty	23
4.2.1	Rodzaje biosurfaktantów	24
4.2.2	Właściwości biosurfaktantów	26
4.2.2.1	Aktywność na granicy faz	26
4.2.2.2	Tolerancja na zmianę temperatury i pH.....	26
4.2.2.3	Biodegradowalność	27
4.2.2.4	Toksyczność	27
4.2.3	Zastosowanie biosurfaktantów	27
4.2.3.1	Bioremediacja	27
4.2.3.2	Przemysł chemiczny i farmaceutyczny	28
4.2.3.3	Przemysł wydobywczy i naftowy.....	29
4.3	Układy bioelektrochemiczne.....	30
4.3.1	Mechanizmy transferu elektronów przez elektroaktywne mikroorganizmy	31
4.3.2	Termodynamiczne aspekty strat w układach bioelektrochemicznych	32
4.3.3	Rodzaje układów BES	34
4.3.4	Elementy budowy	36
4.3.4.1	Elektroaktywny biofilm.....	37
4.3.4.2	Materiały elektrodowe anod i katod	37
4.3.4.3	Membrany i separatory.....	38
4.3.5	Pozostałe czynniki wpływające na wydajność BES	38
4.3.5.1	pH roztworu	39
4.3.5.2	Temperatura procesu	39
4.3.5.3	Przewodność elektrolitu	39
4.3.6	Wpływ biosurfaktantów na wydajność energetyczną	40
4.3.7	Zastosowanie układów bioelektrochemicznych w bioremediacji.....	41

V.	CELE I ZAKRES PRACY.....	44
VI.	METODYKA BADAWCZA	46
6.1	Środowiska mikrobiologiczne.....	46
6.2	Skład pożywek mikrobiologicznych.....	47
6.3	Użyte materiały i konfiguracja reaktorów	48
6.4	Pomiary elektrochemiczne.....	49
6.4.1	Woltamperometria liniowa.....	49
6.4.2	Woltamperometria cykliczna	49
6.4.3	Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna	50
6.4.4	Chronoamperometria	50
6.4.5	Pomiary napięcia ogniwa w czasie rzeczywistym	50
6.5	Badanie występowania biosurfaktantów	51
6.5.1	Pęcherzykowe pomiary napięcia powierzchniowego	51
6.5.2	Pomiar kąta zwilżania.....	51
6.5.1	Analiza otrzymanych próbek biosurfaktantów	51
6.6	Analiza składu chemicznego	53
6.6.1	Chemiczne zapotrzebowanie tlenu (ChZT)	53
6.6.2	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS).....	53
6.7	Analiza morfologiczna biofilmu	54
6.7.1	Mikroskopia fluorescencyjna.....	54
6.7.2	Obrazowanie skaningowym mikroskopem elektronowym	54
6.8	Analiza składu mikrobiologicznego	54
6.8.1	Ekstrakcja DNA.....	54
6.8.2	Sekwencjonowanie genu 16S rRNA i analiza bioinformatyczna.....	55
VII.	WYNIKI I DYSKUSJA.....	56
7.1	Wpływ potencjału anodowego na zależność między bioróżnorodnością a mocą generowaną przez bakterie anodowe wzbogacone z gleby zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi	56
7.1.1	Opis przeprowadzonego doświadczenia	56
7.1.2	Analiza produkcji prądu elektrycznego w trakcie eksperymentu	57
7.1.3	Analiza pomiarów elektrochemicznych.....	59
7.1.4	Analiza społeczności drobnoustrojów w roztworze anolitu i na elektrodzie pracującej	67
7.1.5	Analiza morfologiczna struktury wytworzonego w eksperymencie biofilmu	69
7.1.6	Podsumowanie i wnioski	71
7.2	Zwiększenie wydajności bioelektrochemicznej degradacji ropy naftowej: wykorzystanie materiałów anodowych i zastosowanie enzymu lakazy	72
7.2.1	Opis przeprowadzonego doświadczenia	72
7.2.1	Analiza produkcji prądu elektrycznego w trakcie eksperymentu	73
7.2.2	Analiza pomiarów elektrochemicznych.....	78
7.2.3	Analiza degradacji związków organicznych w trakcie eksperymentu	80
7.2.4	Analiza przeprowadzonych pomiarów kąta zwilżania.....	83

7.2.5	Analiza morfologiczna struktury wytworzonego w eksperymencie biofilmu	85
7.2.6	Podsumowanie i wnioski	87
7.3	Badanie środowisk mikrobiologicznych w poszukiwaniu konsorcjum degradującego ropę naftową przy jednoczesnej produkcji biosurfaktantów	88
7.3.1	Opis przeprowadzonego doświadczenia	88
7.3.2	Analiza produkcji prądu elektrycznego w trakcie eksperymentu	90
7.3.3	Analiza pomiarów elektrochemicznych.....	97
7.3.4	Analiza degradacji związków ropopochodnych przez układy bioelektrochemiczne	112
7.3.5	Podsumowanie i wnioski	118
7.4	Intensyfikacja produkcji związków powierzchniowo czynnych w układach bioelektrochemicznych	120
7.4.1	Opis przeprowadzonego doświadczenia	120
7.4.2	Analiza produkcji prądu elektrycznego w trakcie eksperymentu	121
7.4.3	Analiza pomiarów elektrochemicznych.....	123
7.4.4	Analiza degradacji związków ropopochodnych	130
7.4.5	Analiza przeprowadzonych pomiarów napięcia powierzchniowego	132
7.4.6	Analiza chemiczna otrzymanych produktów degradacji ropy naftowej	135
7.4.7	Podsumowanie i wnioski	137
VIII.	PODSUMOWANIE	138
IX.	DOROBK NAUKOWY	140
9.1	Publikacje naukowe.....	140
9.2	Wystąpienia konferencyjne.....	140
9.3	Udział w projektach i grantach naukowych.....	141
9.4	Pozostała działalność naukowa.....	141
X.	BIBLIOGRAFIA	142

I. Streszczenie

Zanieczyszczenia ropopochodne stanowią poważne wyzwanie ekologiczne ze względu na ich toksyczność oraz trudności w naturalnym procesie degradacji. Wraz z dynamicznym wzrostem globalnego zapotrzebowania na paliwa kopalne, znaczne ilości tych substancji trafiają do atmosfery, wód i gleb. Ich rosnące stężenie w środowisku wymaga opracowania nowych, bardziej efektywnych metod usuwania. Obecnie w remediacji zanieczyszczeń stosuje się trzy główne podejścia: fizyczne, chemiczne i biologiczne. Wykorzystując zalety mikroorganizmów zdolnych do katalitycznej redukcji zanieczyszczeń w warunkach beztlenowych lub mikroaerofilnych oraz produkcji prądu elektrycznego, układy bioelektrochemiczne mogą stanowić atrakcyjną alternatywę dla tradycyjnych metod. Dodatkową korzyścią tych systemów jest jednoczesna produkcja prądu oraz związków chemicznych, takich jak biosurfaktanty, co czyni je jeszcze bardziej atrakcyjnymi w kontekście efektywnej bioremediacji. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zwiększenie wydajności procesu degradacji związków ropopochodnych przy zastosowaniu układów bioelektrochemicznych w postaci mikrobiologicznych ogniw paliwowych.

Część literaturowa poniższej pracy obejmuje przegląd publikacji, monografii, aktów prawnych, norm oraz patentów. Opisano w niej problematykę związaną z remediacją związków ropopochodnych, właściwości i zastosowanie biosurfaktantów w przemyśle i bioremediacji oraz przybliżono najważniejsze aspekty działania układów bioelektrochemicznych. Część eksperymentalna składała się z czterech doświadczeń, w których wykorzystano różne środowiska mikrobiologiczne jako źródła mikroorganizmów zdolnych do degradacji związków ropopochodnych oraz produkcji prądu elektrycznego.

W pierwszym eksperymencie wykorzystano zewnętrzne potencjały, aby przyspieszyć wzrost społeczności mikroorganizmów pochodzących z gleby miejskiej zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi. W tym celu zaprojektowano jednokomorowy układ bioelektrochemiczny z poziomą katodą powietrzną oraz ciągłym mieszaniem. Przebadane zostały trzy wartości potencjałów (-0,3 V; 0,0 V; +0,3 V względem Ag/AgCl), a następnie określono ich wpływ na tempo rozwoju biofilmu. Eksperyment ten po raz pierwszy wykazał pozytywny wpływ potencjału na działanie układów bioelektrochemicznych, w których jako źródło węgla wykorzystano związki ropopochodne. Dodatkowo, wykazano silny wpływ potencjału anodowego na różnorodność społeczności bakterii, wskazując, że społeczności o największej różnorodności były najbardziej skuteczne w bioelektrochemicznej konwersji związków ropopochodnych na energię elektryczną. W eksperymencie udowodniono, że negatywny potencjał (-0,3 V względem Ag/AgCl) miał korzystny wpływ na produkcję prądu elektrycznego w układach bioelektrochemicznych (BES) oraz promował wzrost bardziej bioróżnorodnego biofilmu anodowego.

W kolejnej części pracy porównano trzy różne materiały anodowe: węgiel ze stali nierdzewnej, gąbkę grafitową oraz welon z włókna węglowego, analizując ich wpływ na

produkcję prądu elektrycznego. Dodatkowo zbadano wpływ kosubstratu, jakim był octan sodu, oraz enzymu lakazy na stopień degradacji składników ropy naftowej. Do eksperymentu zastosowano szklany reaktor bateryjny, zawierający sześć półogniw anodowych, w celu zapewnienia identycznych warunków wzrostu biofilmu elektroaktywnego na każdym z materiałów anodowych. Eksperyment wykazał, że najbardziej wydajnym energetycznie materiałem anodowym była wełna ze stali nierdzewnej, która charakteryzowała się najwyższymi wartościami gęstości prądu w każdym cyklu zasilania reaktora. Wysoką wydajność przypisano strukturze anody, charakteryzującej się większymi włóknami większymi przestrzeniami między nimi w porównaniu do materiałów węglowych. Ponadto stwierdzono, że enzym lakazy znacząco zwiększał skuteczność degradacji związków ropopochodnych.

W trzecim eksperymencie przetestowano dziewięć konsorcjów mikrobiologicznych, pochodzących z gleb środowisk antropogenicznych, gleb azjatyckich oraz cieków wodnych, pod kątem produkcji prądu elektrycznego i degradacji składników ropy naftowej. W tym celu wykorzystano jednokomorowe mikrobiologiczne ogniwa paliwowe z katodami powietrznymi. Przeprowadzono dwie serie pomiarowe, w których jako źródło węgla zastosowano octan sodu w połączeniu z ropą naftową lub samą ropą naftową. Eksperyment wykazał, że konsorcja pochodzące z gleb charakteryzowały się wyższą produkcją prądu elektrycznego w porównaniu do konsorcjów z cieków wodnych. Ponadto potwierdzono pozytywny wpływ kosubstratu, którym był octan sodu, na wzrost biofilmu elektroaktywnego, co przyczyniło się do szybszej adaptacji konsorcjów i produkcji prądu o wyższych gęstościach mocy. W badaniach nad degradacją związków ropopochodnych stwierdzono jednak, że konsorcja zasilane wyłącznie ropą naftową wykazywały wyższy stopień degradacji składników ropy naftowej w porównaniu do konsorcjów z dodatkowym kosubstratem. Na podstawie wyników wybrano trzy konsorcja mikrobiologiczne do dalszych badań.

W ostatnim eksperymencie przetestowano trzy wcześniej wybrane konsorcja mikrobiologiczne: kanał ściekowy stacji paliw, separator związków ropopochodnych oraz glebę azjatycką ze Sri Lanki. W ciągu dziewięciu miesięcy badań oceniono wydajność produkcji energii elektrycznej i degradacji związków ropopochodnych oraz zidentyfikowano potencjalne produkty obniżające napięcie powierzchniowe w ogniwach. Zaprojektowano nowy typ ogniwa, składający się z jednej komory anodowej i dwóch połączonych katod powietrznych. Najwyższą gęstość mocy ($221,68 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) oraz wydajność kulombowską wynoszącą $55,28 \pm 9,01 \%$ zaobserwowano dla konsorcjum z kanału ściekowego stacji paliw. Podczas cykli zasilania każdego z konsorcjów mikrobiologicznych zaobserwowano spadek napięcia powierzchniowego. Dodatkowo, badania anolitów z ogni w potwierdziły obecność mono- i diramnofolipidów. Udowodniono tym obecność producentów biosurfaktantów w badanych społecznościach mikrobiologicznych.

Wyniki badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej dostarczają informacje na temat zastosowania układów bioelektrochemicznych w bioremediacji zanieczyszczeń ropopochodnych. W trakcie badań wykazano, że procesy zachodzące w tych układach

mogą prowadzić do produkcji związków powierzchniowo czynnych, takich jak mono- i diramnofilipidy. Otrzymane wyniki mogą stanowić podstawę dla przyszłych badań oraz wdrożeń układów bioelektrochemicznych, przyczyniając się do rozwoju zrównoważonych i skutecznych metod bioremediacji.

II. Abstract

Petroleum-derived pollutants represent a significant ecological challenge due to their toxicity and the difficulty of their natural degradation processes. Along with the dynamic growth of global demand for fossil fuels, substantial quantities of these substances are released into the atmosphere, water, and soil. Their increasing concentration in the environment necessitates the development of new, more effective removal methods. Currently, three main approaches are used in pollution remediation: physical, chemical, and biological. By leveraging the advantages of microorganisms capable of both catalytically reducing pollutants under anaerobic or microaerophilic conditions, and generating electricity, bioelectrochemical systems may provide an attractive alternative to traditional methods. An additional benefit of these systems is their simultaneous production of electricity and chemical compounds, such as biosurfactants, making them even more appealing in the context of efficient bioremediation. The objective of this doctoral dissertation was to enhance the degradation efficiency of petroleum-based compounds using bioelectrochemical systems in the form of microbial fuel cells.

The literature section of this dissertation includes a review of publications, monographs, legal acts, standards, and patents. It describes issues related to the remediation of petroleum-based compounds, the properties of biosurfactants, their industrial and bioremediation applications, and highlights the key aspects of bioelectrochemical systems. The experimental part consisted of four experiments that utilised different microbial environments as sources of microorganisms capable of degrading petroleum-based compounds and generating electricity.

In the first experiment, external potentials were used to accelerate the growth of microbial communities derived from urban soils contaminated with petroleum-based compounds. For this purpose, a single-chamber bioelectrochemical system with a horizontal air cathode and continuous mixing was designed. Three potential values (-0.3 V, 0.0 V, +0.3 V versus Ag/AgCl) were tested, and their effects on the biofilm development rate were assessed. This experiment demonstrated, for the first time, the positive impact of potential on the performance of bioelectrochemical systems using petroleum compounds as a carbon source. Additionally, the anodic potential was shown to have a strong influence on bacterial community diversity, indicating that the most diverse communities were the most effective in bioelectrochemical conversion of petroleum compounds into electrical energy. The experiment confirmed that a negative potential (-0.3 V versus Ag/AgCl) positively influenced electricity production in bioelectrochemical systems (BES) and promoted the growth of a more biodiverse anodic biofilm.

In the next part of the study, three different anode materials: stainless steel wool, graphite sponge, and carbon fibre veil were compared to analyse their impact on electricity production. The influence of a co-substrate, sodium acetate, and the enzyme laccase on the degradation rate of petroleum components was also investigated. A glass battery reactor containing six anode half-cells was used to ensure identical conditions for the growth of electroactive biofilms on each anode material. The experiment showed that the

most energy-efficient anode material was stainless steel wool, which exhibited the highest current density values in each reactor fuelling cycle. Its high efficiency was attributed to its structure, characterized by larger fibres and greater spaces between them compared to carbon materials. Moreover, the enzyme laccase significantly enhanced the degradation efficiency of petroleum compounds.

The third experiment tested nine microbial consortia from anthropogenic soils, Asian soils, and watercourses for electricity generation and petroleum component degradation. Single-chamber microbial fuel cells with air cathodes were used for this purpose. Two series of measurements were conducted using sodium acetate combined with crude oil or crude oil alone as the carbon source. The experiment showed that soil-derived consortia generated more electricity than watercourse-derived consortia. Furthermore, sodium acetate as a co-substrate positively influenced the growth of electroactive biofilms, contributing to faster adaptation of the consortia and the production of higher power densities. However, in studies on petroleum compound degradation, consortia supplied exclusively with crude oil exhibited higher degradation rates compared to those supplemented with a co-substrate. Based on the results, three microbial consortia were selected for further research.

In the final experiment, three previously selected microbial consortia from a gas station wastewater channel, a petroleum compound separator, and Asian soil from Sri Lanka were tested. Over nine months, the efficiency of electricity production and petroleum compound degradation was evaluated, and potential surfactant-lowering products in the cells were identified. A new type of cell was designed, consisting of one anode chamber and two connected air cathodes. The highest power density ($221.68 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$) and coulombic efficiency ($55.28 \pm 9.01\%$) were observed for the consortium from the gas station wastewater channel. During the fuelling cycles of each microbial consortium, a reduction in surface tension was noted. Additionally, analyses of the anolytes confirmed the presence of mono- and dirhamnolipids, demonstrating the existence of biosurfactant producers in the studied microbial communities.

The findings presented in this doctoral dissertation provide insights into the application of bioelectrochemical systems in the bioremediation of petroleum-derived pollutants. The studies showed that the processes occurring in these systems can lead to the production of surface-active compounds, such as mono- and dirhamnolipids. The obtained results may serve as a foundation for future research and the implementation of bioelectrochemical systems, contributing to the development of sustainable and effective bioremediation methods.

III. Spis skrótów i symboli

Skrót	Znaczenie
Ag/AgCl	Elektroda chlorosrebrowa
BES	Układy bioelektrochemiczne (z ang. <i>bioelectrochemical systems</i>)
BGR	Bateryjny szklany reaktor (z ang. <i>battery glass reactor</i>)
BTEX	Mieszanina lotnych węglowodorów aromatycznych – benzenu, toluenu i trzech izomerów ksylenu
CA	Kwasy karboksylowe (z ang. <i>carboxylic acids</i>)
CE	Wydajność kulombowska (z ang. <i>coulombic efficiency</i>)
ChZT	Chemiczne zapotrzebowanie na tlen
CMC	Krytyczne stężenie micelizacji (z ang. <i>critical micelle concentration</i>)
CV	Woltamperometria cykliczna (z ang. <i>cyclic voltammetry</i>)
DET	Bezpośredni transfer elektronów (z ang. <i>direct electron transfer</i>)
EET	Zewnątrzkomórkowy transport elektronów (z ang. <i>extracellular electron transfer</i>)
EIS	Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (z ang. <i>electrochemical impedance spectroscopy</i>)
sEMF	Siła elektromotoryczna ogniwa (z ang. <i>electromotive force</i>)
EPS	Pozakomórkowe substancje polimerowe (z ang. <i>extracellular polymeric substances</i>)
FM	Mikroskop fluorescencyjny (z ang. <i>fluorescence microscope</i>)
GC-MS	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
LSV	Woltamperometria liniowa (z ang. <i>linear sweep voltammetry</i>)
MEC	Mikrobiologiczne ogniwo elektrolizy (z ang. <i>microbial electrolysis cell</i>)
MET	Pośredni transfer elektronów (z ang. <i>mediated electron transfer</i>)
MFC	Mikrobiologiczne ogniwo paliwowe (z ang. <i>microbial fuel cell</i>)

MSM	Roztwór soli mineralnych (z ang. <i>mineral salt medium</i>)
OCP	Potencjał obwodu otwartego (z ang. <i>open circuit potential</i>)
OCV	Napięcie obwodu otwartego (z ang. <i>open circuit voltage</i>)
O/W	Emulsja oleju w wodzie
SCE	Standardowa elektroda kalomelowa (z ang. <i>saturated calomel electrode</i>)
SDS	Dodecylosiarczan sodu (z ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Skaningowy mikroskop elektronowy
SHE	Standardowa elektroda wodorowa
SPE	Ekstrakcja do fazy stałej (z ang. <i>solid phase extraction</i>)
ST	Napięcie powierzchniowe (z ang. <i>surface tension</i>)
TPH	Suma węglowodorów ropopochodnych (z ang. <i>total petroleum hydrocarbons</i>)
WWA	Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
W/O	Emulsja wody w oleju

Symbol	Znaczenie	Jednostka
A	Pole powierzchni	cm^2
AC	Zmiana stężenia substratu w cyklu	%
b_{es}	Liczba elektronów odpowiadających substratowi przypadająca na mol tlenu	-
$ChZT_p$	Początkowa wartość chemicznego zapotrzebowania na tlen	$mg \cdot L^{-1}$
$ChZT_k$	Końcowa wartość chemicznego zapotrzebowania na tlen	$mg \cdot L^{-1}$
Deg	Stopień	$^{\circ}$ lub Deg
E_{anody}	Potencjał anody	V
E_{katody}	Potencjał katody	V
E_{emf}	Potencjał ogniwa (EMF)	V
F	Stała Faradaya	$C \cdot mol^{-1}$
I	Natężenie prądu	A
M_s	Masa cząsteczkowa substratu	$g \cdot mol^{-1}$
n	Liczba elektronów przeniesionych w trakcie reakcji	-
OCV	Napięcie obwodu otwartego (z ang. <i>open circuit voltage</i>)	V
P	Moc	W
Π	Iloraz reakcji lub stała równowagi	$mol \cdot dm^{-3}$
R	Uniwersalna stała gazowa	$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
R_{ChZT}	Zmiana chemicznego zapotrzebowania na tlen	%
R_a	Rezystancja aktywacji	Ω
R_A	Rezystancja anody	Ω
R_c	Opór całkowity układu	Ω
R_C	Rezystancja katody	Ω

R_{ct}	Rezystancja transferu ładunku	Ω
R_{M+E}	Rezystancja sumy składników – oporów membrany i oporów elektrolitu	Ω
R_{ohm}	Rezystancja omowa	Ω
R_{wew}	Optymalny opór wewnętrzny	Ω
R_{zew}	Opór zewnętrzny	Ω
ST	Napięcie powierzchniowe (z ang. <i>surface tension</i>)	mNm^{-1}
T	Temperatura	$^{\circ}C$ lub K
U	Napięcie	V
V	Objętość	L lub dm^3
V_{AN}	Objętość cieczy w przedziale anodowym	dm^3
Z_{im}	Impedancja urojona	Ω
Z_{re}	Impedancja rzeczywista	Ω

IV. Przegląd literaturowy

4.1 Zanieczyszczenia ropopochodne w środowisku

Związki ropopochodne wprowadzone do środowiska zmieniają jego charakter. Węglowodory niszczą strukturę lub hamują rozwój wielu gatunków drobnoustrojów, zmieniając przy tym sposób funkcjonowania ekosystemów [1]. Zanieczyszczenia te mają również znaczący wpływ na rozwój roślin. Duża toksyczność wielu związków zawartych w ropie naftowej może powodować obumieranie korzeni roślin, ograniczając przy tym ich dostęp do wody i soli mineralnych zawartych w glebie. Skutkiem takich zanieczyszczeń jest znaczące pogarszanie się wzrostu roślin i jakości wytwarzanych przez nie plonów [2]. W przypadku braku funkcjonowania podstawowych producentów w ekosystemie, ograniczona zostaje możliwość utrzymywania wyższych form życia takich jak płazy, gady czy ssaki.

Niektóre związki ropopochodne zostały sklasyfikowane jako rakotwórcze [3]. Dodatkowo właściwości fizykochemiczne tych związków sprawiają, że są one łatwo rozprzestrzeniane w środowisku – potwierdza to ich obecność w powietrzu, glebie i zbiornikach wodnych. Takie zanieczyszczenia mogą negatywnie wpływać na środowisko w sposób pośredni (poprzez akumulację w glebie wodach gruntowych) lub bezpośredni (oddziałując na żywe organizmy) [4]. Ze względu na hydrofobowy charakter i wysoką stabilność w środowisku naturalnym, związki ropopochodne akumulowane są w tkankach łącznych oraz w narządach takich jak wątroba i nerki [5].

4.1.1 Źródła zanieczyszczeń ropopochodnych w środowisku

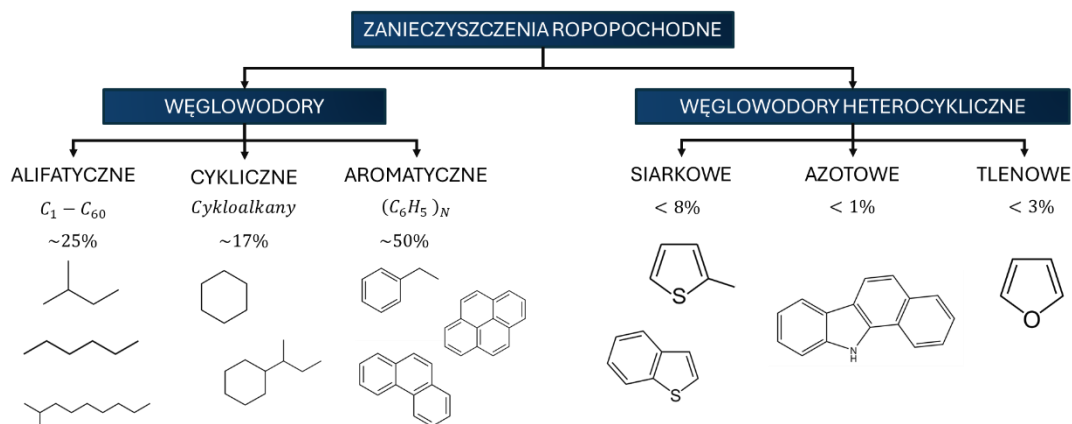
Wraz z szybkim wzrostem globalnego zapotrzebowania na paliwa kopalne duże ilości węglowodorów ropopochodnych przedostają się do atmosfery, wód i gleb. Najważniejsze emisje tych związków związane są z przypadkowymi wyciekami mieszanin substancji chemicznych takich jak olej napędowy, benzyna i smary [6]. Dodatkowo negatywne działania antropogeniczne, takie jak spust do rzek i jezior ścieków komunalnych oraz przemysłowych, nadmierne wydobycie paliw kopalnych, transport, niewłaściwe składowanie zanieczyszczeń oraz działalność przemysłu naftowego na lądzie i na morzu, powodują wzrost poziomu zanieczyszczania środowiska [7].

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) są wysoce niebezpieczne. Niektóre z tych związków zostały uznane za toksyczne, teratogenne, powodujące śmierć lub mutację w procesie akumulacji w tkankach [8]. Dlatego remediacja zanieczyszczeń węglowodorowych ma ogromne znaczenie dla środowiska ekologicznego, bezpieczeństwa żywnościowego i zdrowia ludzkiego.

4.1.2 Klasyfikacja zanieczyszczeń ropopochodnych

Zanieczyszczenia ropopochodne stanowią złożoną mieszaninę związków chemicznych. Związki te zwykle uwalniane są do środowiska w postaci mieszaniny składającej się

z węglowodorów alifatycznych, cyklicznych, aromatycznych oraz związków heterocyklicznych, zawierających cząsteczki tlenu, siarki, azotu i metali. Substancje te oddziałują w różny sposób na środowisko w zależności od ich masy cząsteczkowej, struktury i właściwości [9].



Rysunek 1 Klasyfikacja zanieczyszczeń ropopochodnych występujących w środowisku.

4.1.2.1 Węglowodory alifatyczne

Węglowodory alifatyczne to grupa związków o budowie łańcucha prostego, rozgałęzionego lub cyklicznego. Związki te mogą być nasycone lub nienasycone. Nasycone węglowodory nazywane są alkanami (lub parafinami), ich wzorem ogólnym jest C_nH_{2n+2} , gdzie n oznacza liczbę atomów węgla połączonych wiązaniem pojedynczym. Alkany mogą mieć budowę prostołańcuchową lub rozgałęzioną, tworzącą struktury izomerów o innych właściwościach fizykochemicznych w stosunku do związków prostych o tym samym wzorze sumarycznym [10]. Węglowodory nasycone są na ogół bezbarwne, bezwonne, charakteryzują się niską reaktywnością i łatwą biodegradowalnością przez mikroorganizmy [11].

Cykloalkany (lub nafteny) różnią się od alkanów tym, że ich atomy węgla są połączone, tworząc jeden lub więcej pierścieni. Wzór ogólny naftenów to C_nH_{2n} . Cykloalkany mają podobne właściwości fizyczne i chemiczne jak alkanany. Związki o budowie jednopierścieniowej są podatne na ataki nukleofilowe. Oznacza to, że związki te są mniej stabilne i bardziej reaktywne niż zwykłe alkanany. Dodatkową właściwością cykloalkanów jest wzrost ich stabilności wraz ze wzrostem liczby atomów węgla w ich pierścieniach [10].

Alkeny są zbudowane z łańcuchów prostych, rozgałęzionych lub cyklicznych. W przeciwieństwie do alkanów i cykloalkanów, alkeny poza pojedynczymi wiązaniami (σ) mają wiązania podwójne (π). Dzięki takiej budowie alkeny są bardziej aktywne chemicznie niż alkanany i cykloalkany [10]. Wzór ogólny alkenów jest identyczny jak wzór cykloalkanów – C_nH_{2n} . Związki, w których występują wiązania potrójne (jedno σ oraz dwa π) pomiędzy atomami węgla, nazywa się alkinami.

4.1.2.2 Węglowodory aromatyczne

Związki aromatyczne to grupa związków nienasyconych ze względu na obecność co najmniej dwóch wiązań podwójnych sprzężonych ze sobą w celu utworzenia struktury pierścieniowej. Węglowodory aromatyczne są przedmiotem zainteresowania agencji regulacyjnych ze względu na swoją trwałość i toksyczne działanie w środowisku. Podstawowym związkiem aromatycznym jest benzen (wzór C_6H_6), który może występować pojedynczo lub jako część większych związków. Węglowodory aromatyczne można podzielić na dwie kategorie: monoaromatyczne i wielopierścieniowe.

Do podstawowych związków monoaromatycznych zalicza się benzen, toluen, etylobenzen i ksylene (BTEX z ang. *benzene, ethylbenzene, toluene, xylene*). Są to węglowodory aromatyczne tylko z jednym pierścieniem. Związki te są składnikami benzyny, paliw lotniczych i innych głównych produktów petrochemicznych. Charakteryzują się wysoką rakotwórczością i neurotoksycznością [12,13]. Zanieczyszczenie wód gruntowych związkami BTEX jest trudne do usunięcia, ponieważ są one umiarkowanie rozpuszczalne w wodzie (np. rozpuszczalność benzenu w wodzie równa jest $1780\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ w temperaturze pokojowej) i mogą szybko dyfundować po wprowadzeniu do warstwy wodonośnej. Benzen, jako przedstawiciel związków BTEX, jest najtrwalszym ze związków monoaromatycznych [13].

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) są grupą związków aromatycznych o skondensowanych pierścieniach, których podstawową jednostką budulcową jest benzen. Przykładowymi związkami WWA są: naftalen, fluoren, fenantren, antracen i piren. WWA występują naturalnie w ropie naftowej, złożach węgla, osadach morskich, glebie i wodach gruntowych [14].

WWA są związkami hydrofobowymi o niskiej rozpuszczalności w wodzie oraz niskiej stabilności termodynamicznej. W związku z tym mają tendencję do adsorpcji na powierzchniach cząstek i bakterii, a w środowisku stanowią fazę niemieszającą się z wodą. Wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej i liczby połączonych pierścieni WWA zmniejsza się ich rozpuszczalność i lotność. Ponadto są one uznawane za wysoce toksyczne i rakotwórcze [8]. WWA są uznawane za jedne z trudniejszych w degradacji zanieczyszczeń środowiska ze względu na wysoką wewnętrzną stabilność chemiczną, odporność na różne procesy transformacji [8]. Ze względu na silne oddziaływanie WWA na środowisko wprowadzono rygorystyczne przepisy w sprawie oczyszczania ścieków komunalnych i przemysłowych oraz związane z kontrolą ich emisji do środowiska.

4.1.2.3 Węglowodory heterocykliczne

Węglowodory heterocykliczne są cyklicznymi związkami organicznymi, w których co najmniej jeden układ cykliczny zawiera jeden lub więcej atomów pierwiastków innych niż węgiel. Przykładami takich pierwiastków są: azot, siarka, tlen i metale. Rodzaj struktury pierścieniowej zależy od liczby heteroatomów obecnych w pierścieniach. Nazwy tych związków i ich właściwości zależą od liczby atomów (od trzech do ośmiu)

tworzących pierścienie [15,16]. Do przykładowych związków heterocyklicznych należą: pirol, dioksan, furan, pirydyna, furfural. W zależności od rodzaju i charakteru związków heterocyklicznych, mogą one występować w formie nasyconej lub nienasyconej. Związki te są wysoce reaktywne chemicznie i mikrobiologicznie [15].

4.1.3 Metody remediacji związków ropopochodnych w środowisku

W obliczu wyzwań związanych z występowaniem zanieczyszczeń ropopochodnych rośnie zapotrzebowanie na rozwój nowych oraz usprawnienie obecnie wykorzystywanych metod ich degradacji. Obecnie zarówno w przemyśle, jak i w środowisku stosuje się różnorodne metody remediacji. Można wyróżnić trzy główne podejścia: metody fizyczne, chemiczne oraz biologiczne.

4.1.3.1 Metody fizyczne

Metody fizyczne obejmują technologie odzyskiwania i ograniczania rozprzestrzeniania zanieczyszczeń. Ich celem jest wykorzystanie barier fizycznych do izolowania, a następnie oddzielania zanieczyszczeń z gleby, osadów, wód powierzchniowych i gruntowych. Oczyszczanie fizyczne odbywa się często bezpośrednio w miejscu wycieku. Obejmuje różne procesy, takie jak izolacja i zabezpieczenie gleby, odpienianie wód powierzchniowych, płukanie i ekstrakcja zanieczyszczeń z gleby, adsorpcja na węglu aktywnym [17].

4.1.3.2 Metody chemiczne

Metody oczyszczania chemicznego obejmują technologie remediacji, w których wykorzystuje się środki chemiczne do zatrzymywania, sekwestracji, wytrącania, zatężania i usuwania zanieczyszczeń z gleby, wód powierzchniowych i gruntowych. Metody oczyszczania chemicznego obejmują również remediację w miejscu zanieczyszczenia (*in situ*) przy użyciu takich procesów jak: stabilizacja, zestalanie, immobilizacja, dyspersja, emulgowanie, dehalogenacja oraz utlenianie płynem nadkrytycznym [17].

4.1.3.3 Metody biologiczne

Usuwanie zanieczyszczeń z gleb i wód przy pomocy mikroorganizmów lub produkowanych przez nie związków chemicznych nazywa się metodami biologicznej remediacji. Dobór odpowiedniej metody biologicznej zależy od rodzaju zanieczyszczenia oraz jego lokalizacji. Dodatkowo czynnik doboru metody biologicznej zależy od tego, czy zanieczyszczony obszar ma w przyszłości zostać poddany innym procesom rekultywacji [18].

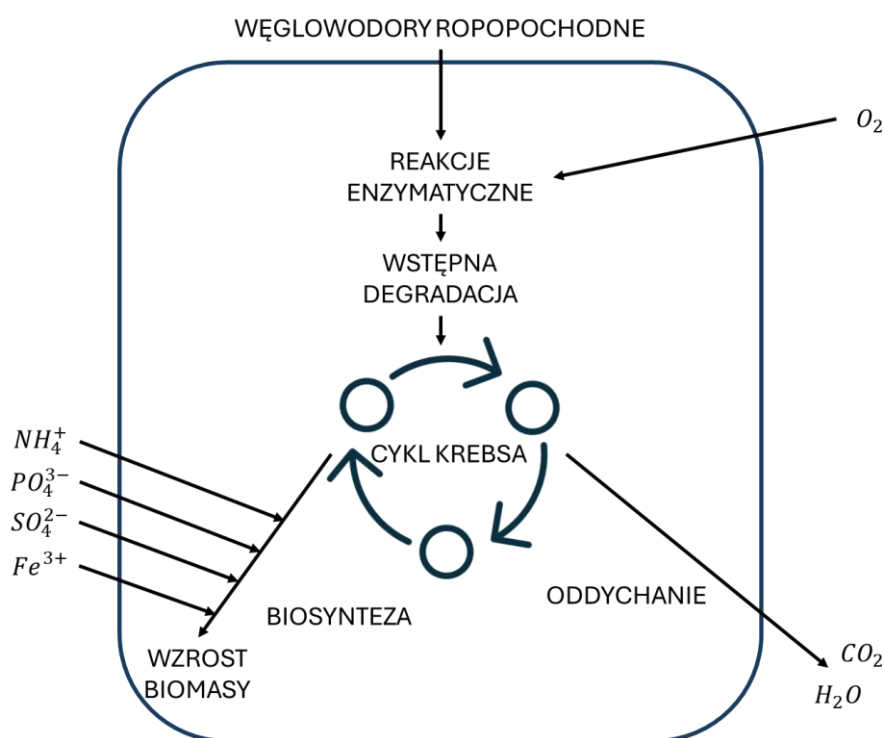
Biologiczne metody remediacji okazały się niezwykle skuteczne w przypadku remediacji *in situ* oraz jako techniki wspomagające remediację poza terenem rekultywacji (*ex situ*). Metody te są wykorzystywane w degradacji węglowodorów ropopochodnych do związków prostych i nietoksycznych substancji bez długoterminowego niekorzystnego

wpływu na środowisko [17]. Metody biologicznej remediacji wymagają długiego okresu oczyszczania, który wynosi od kilku miesięcy do kilku lat.

Metody biologiczne obejmują takie techniki jak: bioremediacja, biostymulacja, bioaugmentacja, biowentylacja, biotransformacja, odpowiednia uprawa gruntów, kompostowanie, wermiremediacja, mykodegradacja, fitoremediacja [17].

Mechanizm degradacji związków ropopochodnych przez mikroorganizmy

Mechanizm degradacji związków ropopochodnych przez mikroorganizmy jest procesem złożonym, składającym się z wielu etapów. Degradacja węglowodorów może zachodzić zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych [19]. Na rysunku 2 przedstawiono jeden z możliwych sposobów degradacji węglowodorów przez mikroorganizmy w warunkach tlenowych [19,20]. Węglowodory ropopochodne zostają wstępnie utlenione w reakcjach enzymatycznych, które są katalizowane przez oksygenazy i peroksydazy. Następnie tak utlenione związki są wstępnie degradowane do produktów pośrednich w trakcie reakcji metabolicznych wewnątrz bakterii. Tak przygotowane zanieczyszczenia przekształcane są krok po kroku w produkty pośrednie centralnego metabolizmu pośredniego, na przykład cykl kwasów trójkarboksylowych (Cykl Krebsa). Biosynteza biomasy komórkowej zachodzi z głównych metabolitów prekursorowych, na przykład acetylo-CoA, bursztynianu, pirogronianu. Cukry niezbędne do różnych biosyntez i wzrostu są syntetyzowane w procesie glukoneogenezy [20].

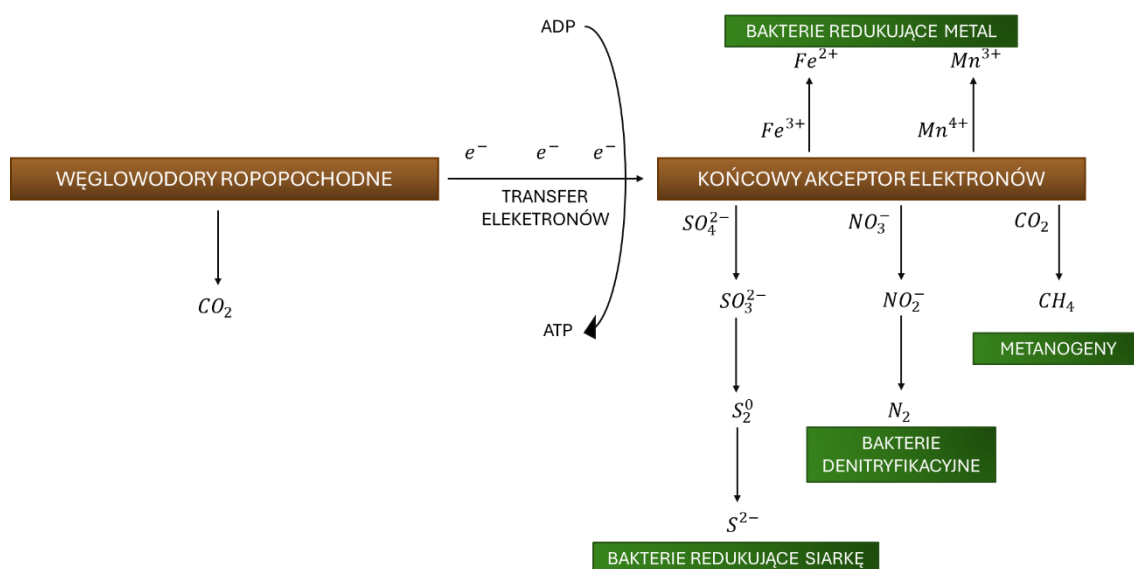


Rysunek 2 Schemat mikrobiologicznego procesu degradacji węglowodorów ropopochodnych w warunkach aerobowych.

Biodegradacja tlenowa związków aromatycznych odbywa się poprzez utlenianie pierścienia enzymami oksygenazy, a następnie rozszczepianie go na mniejsze elementy.

Związki poliaromatyczne o niskiej masie cząsteczkowej mogą być transformowane do trans-dihydrodioli przez bakterie, takie jak *Mycobacterium sp.* przy użyciu monooksygenazy cytochromu P450 [21]. Grzyby natomiast utleniają WWA do chinonów i pochodnych fenolowych poprzez działanie peroksydazy. Enzymy wykorzystują tlen cząsteczkowy do utleniania tych substratów, co prowadzi do hydroksylacji pierścieniowej. Grzyby mają tendencję do biodegradacji większości węglowodorów aromatycznych szybciej niż bakterie [22,23]. Tworzą one pośrednio utlenione produkty, które mogą być dalej utleniane przez bakterie [24]. Jednakże grzyby mają niską zdolność konkurencyjną (zwłaszcza po wprowadzeniu do naturalnego ekosystemu) oraz dłuższy czas aklimatyzacji niż bakterie [25].

W przeciwieństwie do biodegradacji tlenowej, biodegradacja beztlenowa zachodzi głównie w obecności azotanów, siarczanów, żelaza lub metanogenów [26,27]. Związki te stanowią końcowy akceptor elektronów, którym w przypadku biodegradacji tlenowej był tlen. Przykładem bakterii degradujących związki ropopochodne w warunkach beztlenowych są mikroorganizmy redukujące siarczany, które degradują zarówno węglowodory alifatyczne, jak i aromatyczne [26,28]. Biodegradację beztlenową związków aromatycznych obserwuje się również u fakultatywnych beztlenowców przy wykorzystaniu azotanów [29]. Bakterie redukujące żelazo, uczestniczące w procesie beztlenowej degradacji związków organicznych, mogą rozkładać szeroką gamę substancji zanieczyszczających środowisko [30]. Biodegradacja beztlenowa z udziałem metanogenów jest procesem wymagającym termodynamicznie. Jest ona prowadzona przez konsorcja syntroficzne składające się z beztlenowców i metanogenów rozkładających WWA [31,32].



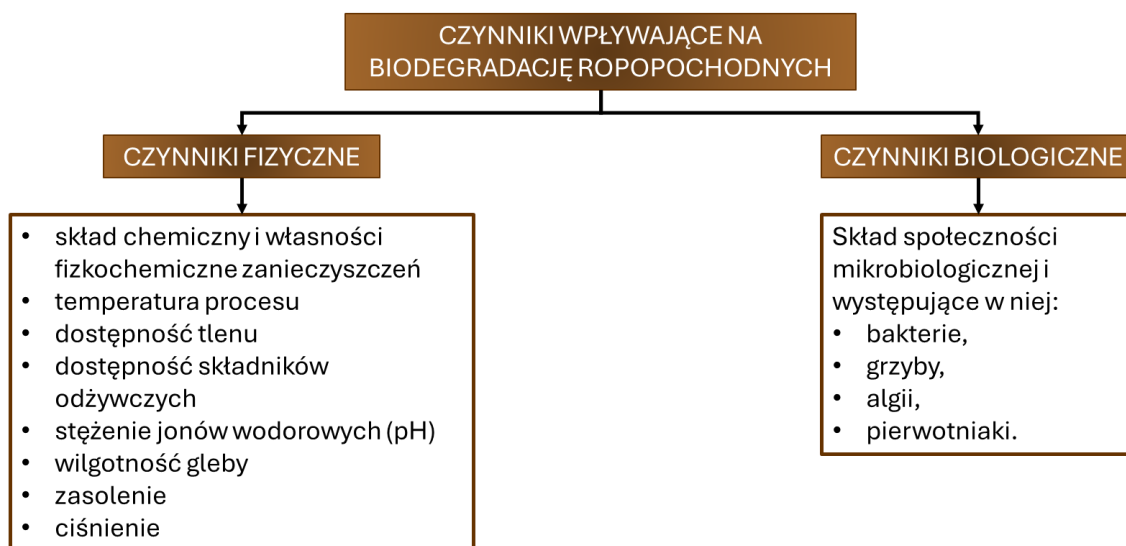
Rysunek 3 Schemat możliwych reakcji anaerobowych degradacji węglowodorów ropopochodnych.

Bioremediacja mikrobiologiczna

Bioremediacja węglowodorów ropopochodnych przy użyciu mikroorganizmów jest badana i wykorzystywana od 1940 roku. Niektóre bakterie i grzyby występujące naturalnie w glebie są zdolne do degradacji węglowodorów ropopochodnych. Zanieczyszczenia te są usuwane lub neutralizowane do nietoksycznych i prostszych związków, takich jak tlenek węgla (IV) i woda. Mikroorganizmy podczas procesów degradacji tych związków wykorzystują niektóre z nich jako składniki odżywcze [33,34]. Metoda ta jest łatwa do kontrolowania, przyjazna dla środowiska oraz niskokosztowa. Przed przystąpieniem do bioremediacji ważne jest, aby ocenić parametry ograniczające, które mogą wpływać na skuteczność procesu. Węglowodory alifatyczne są łatwiej rozkładalne przez mikroorganizmy, podczas gdy węglowodory o długim i rozgałęzionym lub cyklicznym łańcuchu są bardziej odporne na bioremediację [35]. Mikroorganizmy degradujące węglowodory wykorzystują związki węgla do wzrostu, rozmnażania oraz jako źródło energii. *Pseudomonas sp.* są przykładem wyizolowanych bakterii degradujących węglowodory ropopochodne [36]. Ponadto gatunki grzybów, takie jak *Penicillium*, *Fusarium* i *Rhizopus*, zostały wyizolowane i są wykorzystywane w bioremediacji gleby i osadów zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi [37]. W celu zwiększenia wydajności procesu degradacji związków ropopochodnych, mikroorganizmy mogą wytwarzać nowe substancje pośredniczące w procesie degradacji, takie jak enzymy lub biosurfaktanty [20,38].

4.1.4 Czynniki wpływające na biodegradację związków ropopochodnych

W literaturze określono wiele czynników limitujących efektywność biodegradacji. Do najważniejszych zaliczane są: skład chemiczny zanieczyszczenia, temperatura oraz występowanie dodatkowych substancji odżywczych [20]. Skład zanieczyszczeń ropopochodnych jest najważniejszym parametrem wpływającym na przebieg procesu. Lżejsze węglowodory (alifatyczne) ze względu na ich stosunkowo niską masę cząsteczkową wykazują szybszą degradację niż węglowodory aromatyczne, takie jak związki BTEX i WWA [20]. Temperatura jest czynnikiem wpływającym zarówno na efektywność reakcji chemicznych związanych z degradacją związków ropopochodnych, jak i na rozwój mikroorganizmów. Przykładowo, w niskiej temperaturze zwiększa się gęstość roztworu węglowodorów, a zmniejsza lotność związków o niskiej masie cząsteczkowej. Wpływa to zarówno na dostępność węglowodorów dla mikroorganizmów, zwiększając przy tym czas potrzebny na ich degradację, jak i efektywność całego procesu [39].



Rysunek 4 Wykaz czynników środowiskowych wpływających na szybkość biodegradacji związków ropopochodnych w środowisku naturalnym.

Temperatura wpływa również na rozpuszczalność węglowodorów w roztworach wodnych [39,40]. Chociaż degradacja węglowodorów może być przeprowadzana w różnych temperaturach, to w niskich temperaturach proces ten spowalnia. Podczas degradacji ropopochodnych odnotowano podwyższoną aktywność mikroorganizmów w środowiskach psychrofilnych w regionach umiarkowanych [41]. W literaturze określono optima temperaturowe dla degradacji ropopochodnych w glebie (30-40°C), środowisku wody słonej (10-20°C) i słodkiej (15-20°C) [42]. Temperatura otoczenia wpływa zarówno na właściwości zanieczyszczeń, jak i aktywność mikrobiologiczną.

Stężenie związków azotu, fosforu oraz żelaza w środowisku ma wpływ na biodegradację [39]. Niektóre z tych związków stanowią składniki odżywcze, podczas gdy inne mogą hamować rozwój mikroorganizmów. Podczas wycieków ropy naftowej w środowiskach morskich i słodkowodnych wzrasta dostępność węgla, natomiast niedobór jonów azotu i fosforu staje się czynnikiem ograniczającym degradację zanieczyszczeń [43]. Tereny podmokłe słodkowodne i środowiska morskie są uważane za wyjątkowo ubogie w składniki odżywcze, co wynika z obecności wielu gatunków roślin oraz ich zapotrzebowania na te składniki [44]. Dlatego w celu zwiększenia wydajności degradacji konieczne jest suplementowanie niektórych składników odżywczych do środowiska [45]. Z drugiej strony, nadmierne stężenie niektórych składników odżywczych może hamować aktywność mikroorganizmów, co wpływa negatywnie na degradację zanieczyszczeń. Wysokie stężenia jonów azotowych, fosforowych i żelaza mogą mieć negatywny wpływ na biodegradację węglowodorów [46] w szczególności aromatycznych [47].

4.1.5 Wyzwania związane z degradacją związków ropopochodnych

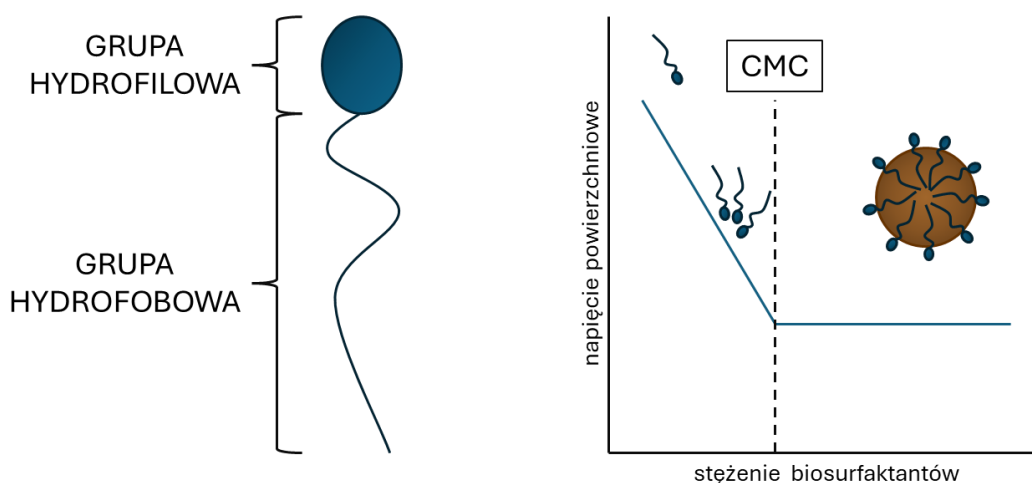
Zanieczyszczenia ropopochodne są trudne do degradacji, przez co utrzymują się przez dłuższy czas, szkodząc ekosystemowi. Biodegradowalność węglowodorów stanowi wyzwanie również ze względu na ich niską biodostępność dla drobnoustrojów, wynikającą z właściwości hydrofobowych i nierozpuszczalności w wodzie. W eksperymentach laboratoryjnych, w zależności od użytych substratów i mikroorganizmów, możliwe jest osiągnięcie wydajności degradacji sięgającej nawet 90 % związków ropopochodnych zawartych w zanieczyszczeniu [48–50].

Bioremediacja nie jest uniwersalną metodą oczyszczania środowiska z zanieczyszczeń ropopochodnych. W wielu przypadkach konieczne jest zastosowanie uzupełniających procesów chemicznych oraz fizycznych. Dodatkowe modyfikacje każdej metody rzutują bezpośrednio na koszt przeprowadzenia procesu. Obniżenie kosztów bioremediacji zwiększyłoby atrakcyjność procesu, co skutkowałoby zwiększeniem ochrony zasobów naturalnych i ekosystemu. Istnieje możliwość zastosowania symulacji numerycznych, które pozwalają określić przybliżoną wydajność procesów. Zabiegi te wymagają jednak zrozumienia wielu zależności panujących w ekosystemie [51]. Dodatkowo, każdorazowemu zastosowaniu produktów mikrobiologicznych powinno towarzyszyć dokładne zrozumienie potencjału zagrożeń i korzyści wynikających z zastosowanych metod.

Istnieje możliwość zwiększenia wydajności bioremediacji poprzez zastosowanie dodatkowych enzymów, nośników enzymatycznych lub wprowadzenie zmutowanych szczepów mikrobiologicznych do środowiska. Powierzchnia tlenku żelaza może działać jako materiał nośnikowy dla enzymu, zapewniając stabilne środowisko i poprawiając wydajność reakcji [52]. Tak uruchomiony enzym można łatwo oddzielić od mieszaniny reakcyjnej, co pozwala na łatwe usunięcie substancji zanieczyszczającej, a także ponowne użycie enzymu [53]. Na szybkość hydrolizy wpływają także interakcje molekularne pomiędzy katalitycznymi częściami aminokwasów a cząsteczkami ligandów w miejscach aktywnych [54]. Dodatkowo, enzymy, takie jak monooksygenazy i hydrolazy mogą zwiększać potencjał utleniający procesu bioremediacji węglowodorów, takich jak pireny, benzopiren, fenantren, naftalen oraz ich pochodne [55,56]. Modyfikacja genu syntezy bursztynianu benzylu może nasilać degradację toluenu i ksylenu [57]. Każda dodatkowa modyfikacja może wpłynąć na przebieg reakcji enzymatycznej, zmieniając szybkość bioremediacji i skuteczność procesu [58,59].

4.2 Biosurfaktanty

Biosurfaktanty to zróżnicowana strukturalnie grupa substancji powierzchniowo czynnych wytwarzanych przez mikroorganizmy. Związki te mają charakter amfifilowy; zbudowane są z dwóch części, tj. grupy polarnej (hydrofilowej) oraz grupy niepolarnej (hydrofobowej). Grupa hydrofilowa składa się z mono-, oligo-, polisacharydów, peptydów lub białek, podczas gdy grupa hydrofobowa zawiera zwykle nasycone i nienasycone reszty kwasów tłuszczowych lub alkoholi [60]. Współczynnik krytycznego stężenia miceli (CMC z ang. *critical micelle concentration*) jest powszechnie stosowany do pomiaru skuteczności środka powierzchniowo czynnego. Określa on stężenie surfaktantu, przy którym roztwór zostaje nasycony cząsteczkami środka powierzchniowo czynnego, a następnie zaczynają tworzyć się micle. Skuteczne biosurfaktanty charakteryzują się niskim CMC, co oznacza, że do zmniejszenia napięcia powierzchniowego wymagane jest niższe stężenie biosurfaktantów [60].



Rysunek 5 Schemat budowy biosurfaktantu oraz wpływ jego stężenia na napięcie powierzchniowe roztworu.

Ze względu na swoją amfifilową strukturę biosurfaktanty zwiększają powierzchnię hydrofobowych substancji nierozpuszczalnych w wodzie, zwiększając także ich biodostępność. Ich aktywność na granicy faz sprawia, że związki te są doskonałymi emulgatorami, środkami pieniącymi oraz dyspergującymi [61]. Biosurfaktanty mogą również zostać wbudowane w błonę komórkową mikroorganizmów, tworząc na ich powierzchni cienką warstwę ułatwiającą kontakt pomiędzy komórkami, strukturami oraz materiałami [62]. W porównaniu do swoich komercyjnych odpowiedników biosurfaktanty posiadają wiele zalet: wysoką aktywność na granicy faz, możliwość użycia w zmiennych warunkach temperaturowych i pH, niską toksyczność i przyjazność dla środowiska [63]. Produkcja tych związków możliwa jest przy wykorzystaniu substratów odpadowych z różnych gałęzi przemysłu, co pozwala nie tylko

na zmniejszenie kosztów procesu produkcji biosurfaktantów, ale również ograniczenie emisji zanieczyszczeń [64].

Ze względu na swoje właściwości biosurfaktanty znajdują szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, takich jak: rolnictwo, produkcja żywności, chemia, kosmetyki, farmaceutyka, górnictwo oraz w procesach remediacji.

4.2.1 Rodzaje biosurfaktantów

W przeciwieństwie do syntetyzowanych w przemyśle środków powierzchniowo czynnych, które są klasyfikowane na podstawie ich dysocjacji w wodzie, biosurfaktanty podzielono według składu chemicznego, masy cząsteczkowej, właściwości fizykochemicznych, sposobu działania oraz pochodzenia mikrobiologicznego. Głównymi grupami biosurfaktantów są związki o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak glikolipidy, lipopeptydy, fosfolipidy oraz związki o dużej masie molekularnej w tym polimerowe biosurfaktanty [65].

Przykładem najdokładniej opisaney w literaturze grupy biosurfaktantów są glikolipidy. Ich cząsteczki składają się z części lipidowej (sfingozyny lub kwasów tłuszczowych), oraz cukrowej (najczęściej galaktoza lub glukoza). Połączenie odbywa się za pomocą grupy eterowej lub estrowej. Wśród glikolipidów najbardziej znane są ramnolipidy, trehalolipidy i soforolipidy.

Lipopeptydy składają się z kwasów tłuszczowych przyłączonych do łańcucha aminokwasów. Surfaktyna, wytwarzana przez *Bacillus subtilis*, jest jednym z lepiej opisanych w literaturze lipopeptydów. Ten anionowy cykliczny związek składa się z heptapeptydu połączonego z β -hydroksykwasem tłuszczowym. Surfaktyna zmniejsza napięcie powierzchniowe wody z $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ do $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, co czyni ją jednym z najsilniejszych biosurfaktantów [66].

Fosfolipidy wraz z towarzyszącymi im kwasami tłuszczowymi produkowane są przez niektóre z bakterii i drożdże w trakcie utleniania n-alkanów. Związki te mogą tworzyć stabilne emulsje olej w wodzie (o/w) oraz woda w oleju (w/o) zależnie od wbudowanych w nie grup funkcyjnych [67]. Ponadto fosfolipidy mogą znacząco skracać czas adaptacji społeczności mikroorganizmów osadowych w trakcie masowego zanieczyszczenia ropą naftową [68].

Biosurfaktanty polimerowe są związkami o dużej masie cząsteczkowej. Przykładami tych związków są emulsan, liposan, lipomanan, alasan i inne kompleksy polisacharydowo-białkowe [62], które charakteryzują się wysokim stopniem emulgacji węglowodorów w roztworach wodnych. Emulsan tworzy stabilną emulsję węglowodorów już przy niskim stężeniu od 0,01 % do 0,001 %, co odpowiada stosunkom emulgatora do węglowodoru 1:100-1:1000 [69].

Główną cechą biosurfaktantów niskocząsteczkowych jest skuteczne obniżanie napięcia powierzchniowego i międzyfazowego, natomiast biosurfaktanty wielkocząsteczkowe skuteczniej stabilizują emulsje typu o/w [70]. Większość biosurfaktantów jest anionowa

lub obojętna, a hydrofobowa część cząsteczki opiera się na długołańcuchowych kwasach tłuszczowych lub pochodnych kwasów tłuszczowych, podczas gdy część hydrofilowa może być węglowodanem, aminokwasem, fosforanem lub cyklicznym peptydem. W tabeli 1 przedstawiono przykłady kilku biosurfaktantów i ich zastosowań w procesie remediacji metali i związków ropopochodnych. Przedstawiono również producentów poszczególnych związków powierzchniowo czynnych.

Tabela 1 Klasyfikacja biosurfaktantów i ich przykładowe zastosowanie w remediacji terenów zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi i metalami ciężkimi.

Rodzaj biosurfaktantu		Producent	Zastosowanie	Referencja
Grupa	Klasa			
Glikolipidy	Ramnofilipidy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Wzmocnienie degradacji i dyspersji różnych klas węglowodorów; emulgowanie węglowodorów i olejów roślinnych; usuwanie metali z gleby.	[71–73]
	Trehalofilipidy	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter sp.</i> <i>Nocardia sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i>	Zwiększenie biodostępności węglowodorów.	[74]
	Soforofilipidy	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Torulopsis apicola</i>	Odzyskiwanie węglowodorów z mułów rzecznych; usuwanie metali ciężkich z osadów; usprawnienie wydobywania ropy.	[72]
Lipopeptydy	Surfaktyna	<i>Bacillus subtilis</i>	Wzmocnienie biodegradacji węglowodorów i chlorowanych pestycydów; usuwanie metali ciężkich z zanieczyszczonej gleby, osadów i wody.	[75,76]
	Lichenizyna	<i>Bacillus licheniformis</i>	Usprawnienie wydobywania ropy.	[77]
Kwasy tłuszczowe, fosfolipidy i lipidy obojętne	Kwas spikulisporowy	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Usuwanie jonów metali z roztworu wodnego; działanie dyspersyjne dla pigmentów hydrofilowych; przygotowanie organożeli typu emulsyjnego, bardzo	[78]

			drobnych mikrokapsulek (pęcherzyków lub liposomów), sekwestrantów metali ciężkich.	
	Fosfatydyloetanoloamina	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Zwiększenie tolerancji bakterii na metale ciężkie.	[79]
Biosurfaktanty polimery	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Stabilizacja emulsji węglowodór-woda.	[62,80]
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53		[62,81]
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>		[63,82]

4.2.2 Właściwości biosurfaktantów

Biosurfaktanty stanowią grupę związków o różnorodnych cechach. Poniżej zostały przedstawione ich kluczowe właściwości fizykochemiczne, takie jak: aktywność na granicy faz, tolerancja na temperaturę i pH, biodegradowalność oraz toksyczność.

4.2.2.1 Aktywność na granicy faz

Wydajny środek powierzchniowo czynny powinien charakteryzować się dużymi spadkami napięcia powierzchniowego w roztworach wodnych, które mogą spaść z 72 do 35 mN·m⁻¹ i spadkami napięcia międzyfazowego roztworu wody i heksadekanu z 40 do 1 mN·m⁻¹ [83]. Surfaktyna wytwarzana przez *Bacillus subtilis*, ramnolipidy wytwarzane przez *Pseudomonas aeruginosa* oraz soforolipidy produkowane przez *Candida bombicola* są związkami, które prowadzą do spadku napięcia powierzchniowego wody poniżej 35 mN·m⁻¹ jednocześnie obniżając napięcie fazowe pomiędzy wodą a heksanem do <1 mN·m⁻¹ [84–86].

Ważną cechą biosurfaktantów jest niskie CMC, które w porównaniu do komercyjnych środków powierzchniowo czynnych jest od dziesięciu do czterdziestu razy mniejsze. Oznacza to, że mniejsza ilość środka powierzchniowo czynnego jest potrzebna do uzyskania maksymalnego spadku napięcia powierzchniowego. CMC dla surfaktyny osiągnięte jest już dla stężenia 15,6 mg·L⁻¹, co jest wartością niższą o 96 %, 83 % i 45 % niż stężenia syntetycznych surfaktantów takich jak: LAS (z ang. *Linear alkilbenzene sulfonate*), Glucopone215 (alkilopoliglukozyd) i Glucopone650 (alkilopoliglukozyd) [86,87].

4.2.2.2 Tolerancja na zmianę temperatury i pH

Na stabilność biosurfaktantów wpływa wiele czynników. Temperatura, pH, czy stężenie NaCl (do stężenia 50 g·L⁻¹) nie mają znaczącego wpływu na trwałość surfaktantów produkowanych przez bakterie [88]. Niektóre ze związków produkowane przez bakterię *Bacillus* utrzymują swoje właściwości do obniżania napięcia powierzchniowego po podgrzaniu do temperatury 120°C, w zakresie pH od 4 do 10 oraz przy stężeniu NaCl równym 10 % (w/v) [89]. Dodatkowo niska temperatura nie ma wpływu na aktywność

powierzchniową, co zostało zweryfikowane przez trzymanie ramnolipidów wytworzonych przez bakterię *Pseudomonas* przez sześć miesięcy w temperaturze -20°C [90].

4.2.2.3 Biodegradowalność

Ze względu na budowę biosurfaktantów z łańcuchów węglowodorów, biopolimerów lipidów, białek, peptydów i cukrów, związki te są bardziej biodegradowalne niż ich komercyjne odpowiedniki. Ramnolipid, związek produkowany przez bakterię *Pseudomonas sp.*, może zostać zdegradowany zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych [91], a wydajność takiej biodegradacji może wynosić nawet 92 % w środowisku glebowym [92]. Dodatkowo ramnolipid ma wyższą podatność na degradację w środowisku wodnym i glebowym niż syntetycznie produkowany dodecylosiarczanu sodu (SDS z ang. *sodium dodecyl sulfate*). Tak wysoka podatność na biodegradację wskazuje na mniejsze ryzyko akumulacji biosurfaktantów w trakcie wykorzystywania ich na przykład w procesie bioremediacji [93].

4.2.2.4 Toksyczność

Ważnym aspektem wpływającym na możliwość zastosowania biosurfaktantów w przemyśle jest ich niska toksyczność oraz niska mutagenność. Wykazano, że wybrane biosurfaktanty produkowane przez *Marinobacter* i *Pseudomonas* nie wskazują cytotoksyczności i mutagenności w modelach *in vitro* ludzkiej skóry i wątroby [94]. Poprzez pomiar redukcji emisji światła zbadano toksyczność bioluminescencyjną bakterii *Vibrio fischeri*. Potwierdzono również, że biosurfaktanty mają niższą toksyczność w porównaniu z dodecylosiarczanem sodu [88].

4.2.3 Zastosowanie biosurfaktantów

Biosurfaktanty można wytwarzać przy użyciu zasobów odnawialnych i produktów odpadowych. Dzięki swoim właściwościom znajdują one szerokie zastosowanie w przemyśle jako emulgatory i demulgatory, detergenty, środki pieniące i zwilżające, a także jako składniki żywności.

4.2.3.1 Bioremediacja

Jednym z głównych zastosowań biosurfaktantów jest bioremediacja zanieczyszczeń związanych z wyciekami ropy naftowej oraz usuwanie jonów metali ciężkich z gleb i zbiorników wodnych. W procesie bioremediacji mikroorganizmy wykorzystują zanieczyszczenia jako źródło węgla i energii, przekształcając je w CO₂, wodę i sole mineralne [76]. Hydrofobowość zanieczyszczeń jest krytycznym czynnikiem ograniczającym proces bioremediacji, jednak może być modyfikowana za pomocą środków powierzchniowo czynnych wytwarzanych przez bakterie.

W literaturze opisano zastosowanie biosurfaktantów w procesie bioremediacji zanieczyszczonej gleby i ścieków. W publikacji R. Patowary'ego i in. opisano

zastosowanie ramnolipidu uzyskanego przy użyciu *Pseudomonas aeruginosa* SR17 do bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejami napędowymi. W badaniu oceniono degradację zanieczyszczeń ropopochodnych dla dwóch różnych stężeń TPH 6800 ppm i 8500 ppm. Porównano skuteczność ramnolipidu z syntetycznym dodecylosiarczanem sodu. Gleba traktowana ramnolipidem wykazała skuteczność degradacji na poziomie 86,1 % i 80,5 %, podczas gdy zastosowanie syntetycznego środka powierzchniowo czynnego pozwoliło osiągnąć wydajność równą 70,8 % i 68,1 % [95].

Dodatek lipopeptydu wytwarzanego przez *Acinetobacter sp.* zwiększył aktywność mikrobiologiczną i wzrost *Pseudomonas sp.* i *Rhizobium sp.* Bakterie te mogły degradować węglowodory, zmniejszając ilość n-alkanów i wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych w środowisku, osiągając przy tym wydajność równą 94 % i 77 % [96]. W artykule Swati'ego i in. wykazano, że biosurfaktant wytwarzany przez szczep *Pseudomonas sp.* ISTPY2, wyizolowany ze składowiska odpadów w Ghazipur, wykazywał skuteczność degradacji pirenu obecnego w wysokim stężeniu w glebie. W badaniu tym osiągnięto skuteczność degradacji równą 94 % w ciągu 10 dni [97].

W badaniach W. Suna i in. wykorzystano biosurfaktant produkowany przez *Pseudomonas sp.* CQ2. Gatunek ten został wyizolowany z pola naftowego Chongqing (Chiny) do bioremediacji metali ciężkich w zanieczyszczonej glebie. Wydajność procesu usuwania metali z gleby wyniosła odpowiednio 78,7 %, 65,7 % i 56,9 % dla związków kadmu (Cd), miedzi (Cu) i ołowiu (Pb). Wartości te były wyższe niż te uzyskane przy użyciu dostępnych komercyjnie środków powierzchniowo czynnych [98].

4.2.3.2 Przemysł chemiczny i farmaceutyczny

Biosurfaktanty mogą pełnić różnorodne funkcje w przemyśle farmaceutycznym, ponieważ mają działanie antybakteryjne, antyadhezyjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, plemnikobójcze, hemolityczne, przeciwzapalne i immunomodulujące [99].

Badania M. Ohadi'ego oraz N. de Andrade Teixeira Fernandes i in. nad biosurfaktantami lipopeptydowymi potwierdzają ich działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwbiofilmowe i cytotoksyczne. Emulsan i alasan wyprodukowane przez *Acinetobacter junii sp.* wykazywały działania hamujące rozwój bakterii *Candida utilis*, stając się potencjalnym nowym lekiem [100]. Szczep *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 wykorzystano w procesie degradacji oleju z odpadów kuchennych, w wyniku którego wytworzony został biosurfaktant. Związek ten charakteryzował się właściwościami larwobójczymi dla larwy *Aedes aegypti*. Dodatkowo powodował on zahamowanie wzrostu niektórych bakterii, takich jak: *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, i grzybów: *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum* i *Fusarium* [101].

Dodatkowo biosurfaktanty stosuje się w przemyśle kosmetycznym. Związki te posiadają niższą toksyczność i zapewniają lepszą zgodność ze skórą i działanie nawilżające

w porównaniu do syntetycznych środków powierzchniowo czynnych [102]. W literaturze opisane zostało zapotrzebowanie na ekologiczne kosmetyki, które zastępują produkty syntetyczne. W artykule A. Ferreiry i in. opisano biosurfaktant produkowany przez szczep *Lactobacillus paracasei*. Związek ten porównano z dodecylosiarczanem sodu. Wykazały one identyczną zdolność do produkcji emulsji typu o/w. Dla obu związków nie zaobserwowano działania toksycznego. SDS wykazywał jednak silne działanie hamujące na fibroblasty, co było zjawiskiem niepożądanym [103]. Innymi przykładami dostępnych na rynku produktów zawierających biosurfaktanty są: krem nawilżający Kanebo (Kanebo Cosmetics, Tokio, Japonia), środek do czyszczenia twarzy Sopholiance (Givaudan Active Beauty, Paryż, Francja) i krem nawilżający do ciała Relipidium (BASF, Monheim, Niemcy) [104].

4.2.3.3 Przemysł wydobywczy i naftowy

Właściwości biosurfaktantów pozwalają na ich wykorzystanie w sektorze wydobywczym i naftowym. Są dwa sposoby zastosowania tych związków. Pierwszy polega na wstrzykiwaniu wyprodukowanych laboratoryjnie biosurfaktantów do zbiornika, a drugi na identyfikacji mikroorganizmów obecnych w zbiorniku i wspierania ich wzrostu w celu syntezy potrzebnych związków [105].

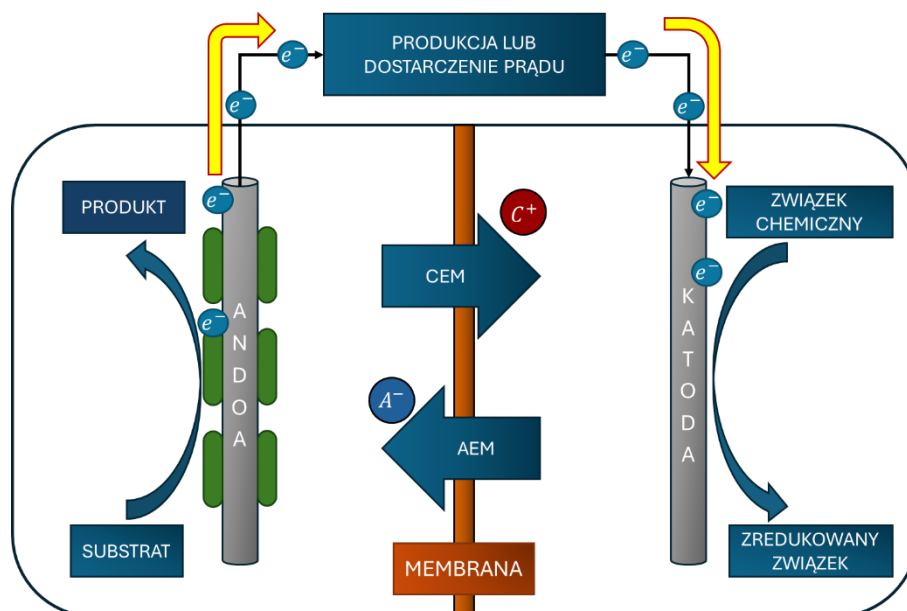
Ropa naftowa często wymaga transportu na duże odległości z pól wydobywczych do rafinerii, co wiąże się z wieloma trudnościami. Głównym problemem w transporcie jest niska płynność wynikająca zarówno z wysokiej lepkości, jak i dużej zawartości asfaltenów i parafin w ropie naftowej. Związki te mogą powodować spadek ciśnienia w układzie, co przekłada się na zatykanie rurociągu [106]. Wytworzenie stabilnej emulsji typu o/w, może ułatwić transport paliwa na duże odległości. Warto zastosowania są szczególnie emulgatory na bazie biosurfaktantów, takich jak emulsan. Produkty te nie tylko mogą zmniejszyć napięcie międzyfazowe roztworu, ale również doskonale stabilizować emulsję typu o/w. Ze względu na dużą liczbę grup reaktywnych w cząsteczce biosurfaktanty ściśle wiążą się z kropelkami oleju i tworzą skuteczną barierę zapobiegającą koalescencji kropeł [107].

Proces wspierania wzrostu mikroorganizmów w celu zwiększenia odzysku ropy nazwano wzmocnionym mikrobiologicznie odzyskiem ropy naftowej (MEOR z ang. *Microbial Enhanced Oil Recovery*). W pracy R. De Cássia i F. S. Silva i in. opisano konsorcjum składające się z trzech szczepów beztlenowych. W jego skład wchodziły mikroorganizmy hipertermofilne, kwasogenne i piezofile, które wykorzystano w podwyższonej temperaturze (od 70°C do 90°C). Zastosowanie tego konsorcjum drobnoustrojów zwiększyło proces odzyskiwania ropy naftowej i wydajność usuwania jej z roponośnych formacjach skalnych [107]. Zmodyfikowany szczep bakterii *Bacillus Nealsonii* został wykorzystany do produkcji biosurfaktantu w podłożu zawierającym naftę jako źródło węgla. Następnie wyprodukowany związek został zastosowany w MEOR w temperaturze pokojowej (27°C). Wydajność tego procesu wynosiła 68,42 % odzysku po pierwotnym i wtórnym odzyskiwaniu oleju [108].

4.3 Układy bioelektrochemiczne

Układy bioelektrochemiczne (BES z ang. *bioelectrochemical system*) są systemami zdolnymi do konwersji energii zawartej w wiązaniach chemicznych odpadów organicznych na energię elektryczną, wodór lub inne produkty chemiczne. Układy te wykorzystują bakterie elektroaktywne, które przetwarzając substraty produkują elektrony i protony. Elektrony transportowane są zewnętrznym obwodem z anody na katodę. Następnie na powierzchni katody zachodzą reakcje z udziałem protonów i elektronów. Mikroorganizmy tworzące biofilm anodowy odgrywają kluczową rolę w BES, ponieważ mogą utleniać różnorodne związki organiczne odporne na degradację [109,110]. Dodatkową zaletą BES jest to, że w zależności od zastosowanych substratów oraz wykorzystywanych mikroorganizmów, możliwa jest produkcja w nich kwasów organicznych, alkoholi i biosurfaktantów [111,112].

W przeciwieństwie do tradycyjnych systemów elektrochemicznych, układy bioelektrochemiczne pracują w łagodniejszych warunkach procesu. Dodatkowo, w konwencjonalnych procesach elektrochemicznych często stosowane są elektrody z metali szlachetnych lub dodatkowe katalizatory reakcji, podczas gdy w BES nie jest to konieczne, a przez to ich stosowanie jest tańsze [113]. W porównaniu z innymi technologiami bioremediacji stosowanymi *in situ*, elektrody użyte w BES zapewniają dostęp do donorów i akceptorów elektronów, co sprzyja mikrobiologicznym reakcjom redoks. Dzięki temu można uniknąć stosowania dodatkowych utleniaczy i reduktorów, co zapobiega wtórnemu zanieczyszczeniu środowiska [114].



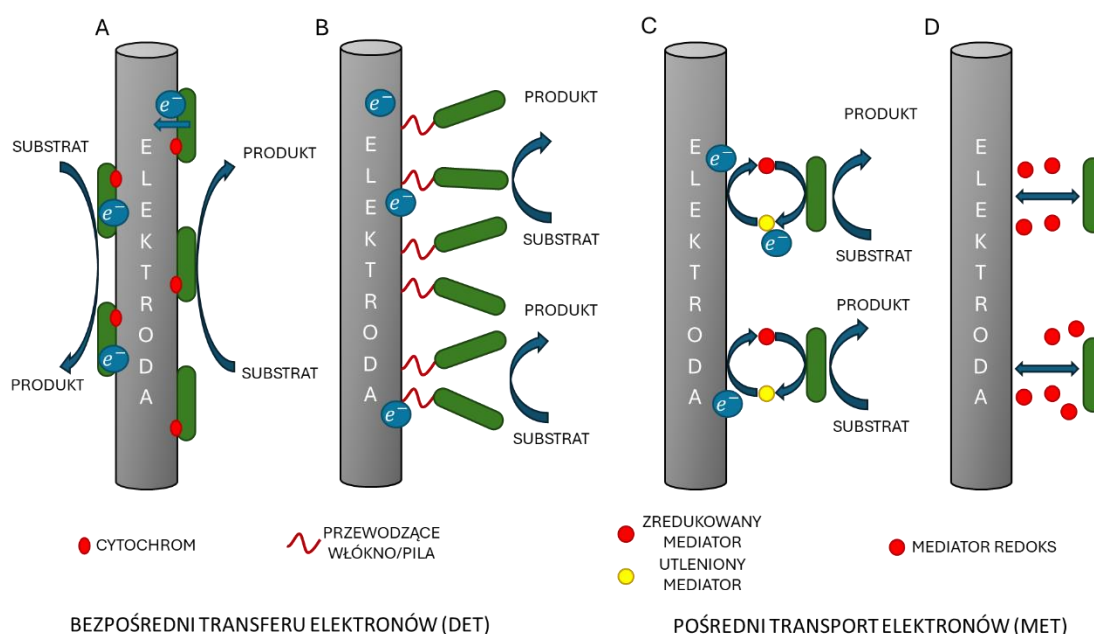
Rysunek 6 Schemat budowy układu bioelektrochemicznego.

Bakterie odgrywają kluczową rolę w remediacji mikrobiologicznej, stanowiąc podstawę dla układów bioelektrochemicznych. Przez proces zewnątrzkomórkowego transferu elektronów (EET z ang. *extracellular electron transfer*) bakterie prowadzą proces utleniania zanieczyszczeń na elektrodach [110,115]. Jednakże zdolność bakterii do

przeprowadzania EET może być różna w zależności od rodzaju substancji zanieczyszczających i użytych mikroorganizmów.

4.3.1 Mechanizmy transferu elektronów przez elektroaktywne mikroorganizmy

Proces zewnątrzkomórkowego transportu elektronów pełni kluczową funkcję w układach bioelektrochemicznych. W takich układach transport elektronów na powierzchni elektrod odbywa się według różnych mechanizmów EET: bezpośredniego transferu elektronów (DET z ang. *direct electron transfer*) oraz pośredniego transferu elektronów (MET z ang. *mediated electron transfer*) [110,116]. Proces transportu elektronów w obecności mikroorganizmów może zachodzić przy zastosowaniu obu mechanizmów w tym samym czasie. Na przykład, proces EET u *Geobacter sulfurreducens* przebiega jednocześnie z wykorzystaniem: cytochromów, pili przewodzących lub mediatorów [117].



Rysunek 7 Mechanizmy EET w układach bioelektrochemicznych: **A** – bezpośredni transfer elektronów; **B** – transfer elektronów przez przewodzące włókno/pilę; **C** transfer elektronów poprzez wahadłowy system redoks; **D** – transfer elektronów poprzez mediatory redoks.

W procesie DET mikroorganizmy gram-ujemne przekazują elektrony za pomocą cytochromów błony zewnętrznej lub samoorganizujących się włókien/pili przewodzących. Jednak wiele mikroorganizmów nie posiada zdolności do bezpośredniego transferu elektronów i zamiast tego wykorzystuje metody pośrednie [115]. Proces MET zachodzi w obecności mediatora redoks, który pełni rolę nośnika elektronów. Mediator może być endogenne (produkowany przez bakterie) lub egzogenne (dodawany z zewnątrz) [118]. Dodatkowo, mediator powinien charakteryzować się niską toksycznością dla mikroorganizmów, łatwością przenikania przez błonę komórkową oraz wysokim potencjałem redoks.

4.3.2 Termodynamiczne aspekty strat w układach bioelektrochemicznych

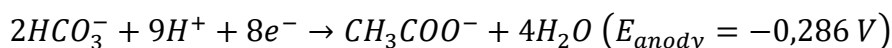
Aby układ bioelektrochemiczny mógł działać, musi zostać wytworzona różnica potencjałów pomiędzy elektrodami, która inicjuje siłę napędową przepływu elektronów między nimi. Zjawisko to jest znane jako siła elektromotoryczna ogniwa (EMF z ang. *electromotive force*). Energia swobodna Gibbsa jest ściśle powiązana z EMF ogniwa, ponieważ jest to ilość energii dostępnej do napędzania przepływu elektronów w obwodzie zewnętrznym [119]. Energia swobodna Gibbsa i EMF ogniwa to ważne parametry oceniające wydajność elektrochemiczną układu bioelektrochemicznego, a ich relację można przedstawić równaniem:

$$E_{emf} = E_{emf}^0 - \frac{RT}{nF} \ln(\Pi)$$

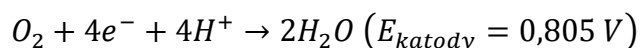
Gdzie: E_{emf} – siła elektromotoryczna ogniwa, E_{emf}^0 – siła elektromotoryczna ogniwa w warunkach standardowych, R – stała gazowa ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$), T – temperatura (K), n – liczba elektronów przeniesionych w trakcie reakcji, F – stała Faradaya, Π – iloraz reakcji lub stała równowagi.

Wartości potencjału elektrody na obu półogniwach zależą od reakcji utleniania i redukcji zachodzących na elektrodach. Przykładowo, w przypadku BES zawierającego platynowaną katodę i anodę wykonaną z materiału węglowego, dodano roztwór o obojętnym pH zawierający 5 mM octanu sodu. Dla tak przygotowanego ogniwa reakcje półogniw można przedstawić w następujący sposób [119]:

Reakcja na anodzie:



Reakcja na katodzie:



EMF tego układu można wyrazić jako różnicę potencjałów półogniw:

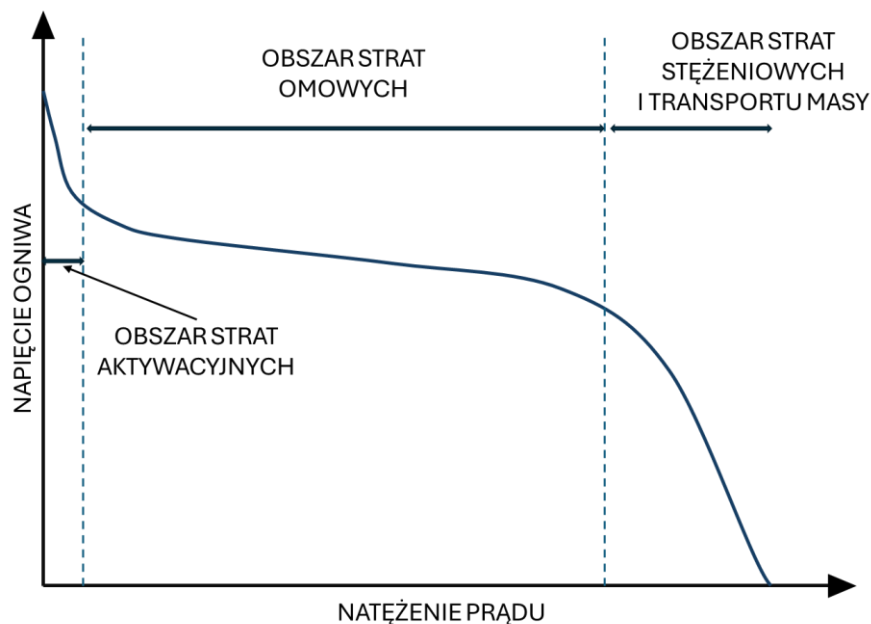
$$E_{emf} = E_{katody} - E_{anody}$$

Po podstawieniu potencjałów poszczególnych elektrod do równania EMF tego układu wyniesie:

$$E_{emf} = 0,805 - (-0,296) = 1,106 V$$

Napięcie obwodu otwartego (OCV z ang. *open circuit voltage*) jest mierzone w momencie, gdy nie ma przepływu prądu lub gdy rezystancja jest zerowa lub bliska zera [120]. W idealnym ogniwie OCV byłoby wyższe lub równe teoretycznej (maksymalnej) wartości EMF (opartej na potencjałach anody i katody). OCV jest w rzeczywistości niższe od teoretycznego EMF ze względu na szereg wewnętrznych strat w ogniwie elektrochemicznym i roztworze elektrolitu oraz na obu elektrodach. Te wewnętrzne straty

stanowią ograniczenia w BES, które trzeba zminimalizować, aby osiągnąć wyższą sprawność energetyczną. Straty w BES można określić przy pomocy pomiarów elektrochemicznych, takich jak woltamperometria liniowa (LSV z ang. *linear sweep voltammetry*) lub elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS z ang. *electrochemical impedance spectroscopy*) [121]. Można je również podzielić na cztery rodzaje: aktywacyjne, omowe, stężeniowe i transportu masy lub straty metaboliczne bakterii [122].



Rysunek 8 Obszary strat w transporcie ładunku elektrycznego zbadane techniką woltamperometrii liniowej w celu oceny wydajności układu bioelektrochemicznego.

Straty aktywacyjne

Straty aktywacyjne są związane z energią potrzebną do zainicjowania anodowych i katodowych reakcji redoks podczas przenoszenia elektronów na granicy faz elektroda/elektrolit [122]. Straty te mogą być bezpośrednio związane ze związkami ulegającymi utlenianiu lub mechanizmem transportu elektronów [123]. Zwiększenie powierzchni elektrody oraz podniesienie temperatury roboczej do maksymalnego poziomu tolerowanego przez mikroorganizmy może skutkować zmniejszeniem tego rodzaju strat.

Straty omowe

Każdy z elementów budowy układu bioelektrochemicznego posiada własną rezystywność (biofilm, elektroda, zewnętrzny obwód elektryczny, separator i elektrolit). Suma oporów wszystkich elementów nazywana jest stratami omowymi [122]. Straty te mogą być minimalizowane poprzez zmniejszenie odstępów między elektrodami, zastosowanie wysokiej jakości membrany i zwiększenie przewodności elektrolitu zarówno w komorze anodowej, jak i katodowej.

Straty stężeniowe i transportu masy

Straty stężeniowe powstają głównie w wyniku ograniczeń transportu masy związków chemicznych do lub z elektrod, zwłaszcza w wyniku powstawania dyfuzyjnych gradientów stężeń, oraz przy wysokich wartościach generowanego prądu [122]. Nieefektywne przenoszenie masy poprzez dyfuzję, konwekcję lub usuwanie metabolitów przez mikroorganizmy może ograniczyć maksymalną produkcję prądu na elektrodzie. Zjawisko to można zminimalizować, zwiększając dostępność substratu w przestrzeni reaktora poprzez mieszanie. W przypadku wysokiego natężenia produkowanego prądu wystąpić może zjawisko przeregulowania (z ang. *overshoot phenomenon*), które ma bezpośredni wpływ na wzrost rezystancji w układzie. Zjawisko to polega na tym, że podczas zwiększania gęstości prądu moc wyjściowa początkowo rośnie, osiąga szczyt, a następnie spada, co prowadzi do nieprawidłowego oszacowania wydajności MFC przy wysokich gęstościach prądu. Przyczyną tego zjawiska jest niedostateczna adaptacja biofilmu anodowego do wysokich potencjałów anody, co ogranicza zdolność biofilmu do efektywnego transferu elektronów przy wyższych potencjałach [124].

Straty metaboliczne bakterii

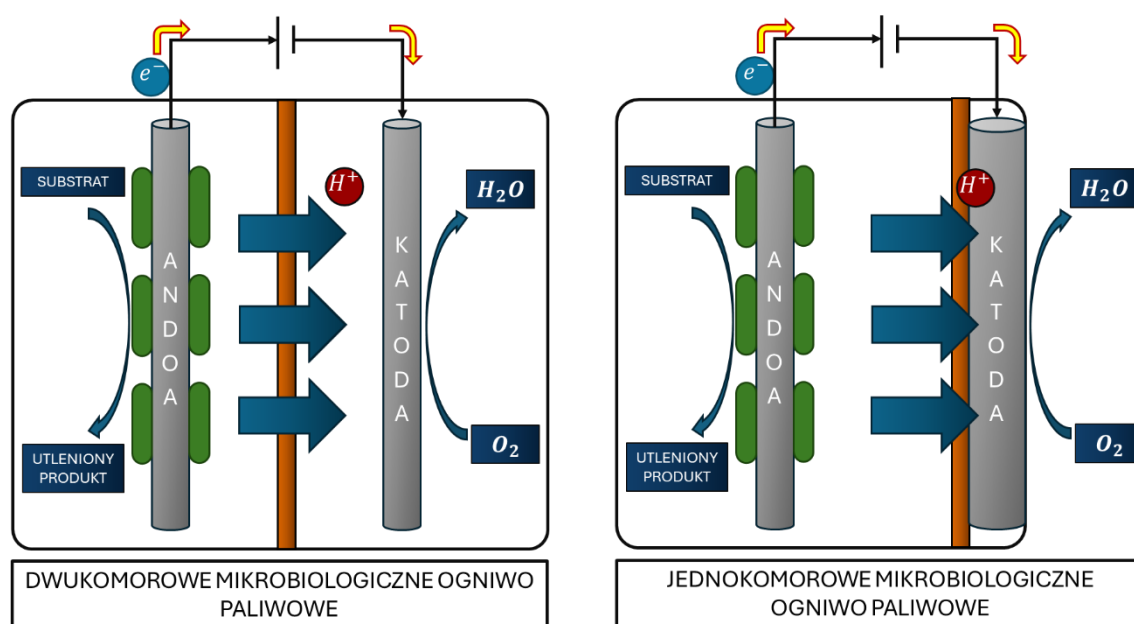
Straty metaboliczne bakterii wynikają z przekierowania energii uzyskanej przez mikroorganizmy na rozwój biomasy lub wytwarzanie alternatywnych szlaków metabolicznych [122]. Im większa jest różnica potencjałów redoks między elektroaktywnym biofilmem a elektrodą, tym większe są straty i mniejsze napięcie ogniwa. Niepożądane jest powstawanie alternatywnych szlaków, takich jak fermentacja lub metanogeneza ze względu na powstałe produkty uboczne. Metanogeneza w BES nie zmniejsza efektywności degradacji substratu, ale gwałtownie zmniejsza produkcję elektronów, a także wpływa na mikrobiom lub inne reakcje biochemiczne [125]. Nadmierne gromadzenie się biofilmu na elektrodzie również nie jest pożądane. Złożone zbiorowiska mikroorganizmów zaszczerpione w systemach BES generują lepsze wyniki niż hodowle pojedynczych gatunków. Zbyt gęsty biofilm może jednak prowadzić do biofoulingu, który ma negatywny wpływ na przewodnictwo elektronów [126].

4.3.3 Rodzaje układów BES

W zależności od zastosowania BES można podzielić na systemy elektrogenyzy i elektrohydrogenyzy, mikrobiologiczne ogniwa paliwowe, mikrobiologiczne systemy odsalania, mikrobiologiczne systemy elektrosyntezy i systemy oczyszczania bioelektrochemicznego. Najczęściej opisywanymi układami BES wykorzystywanymi w bioremediacji są natomiast mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MFC z ang. *Microbial Fuel Cell*) i mikrobiologiczne ogniwa elektrolityczne (MEC z ang. *Microbial Electrolysis Cells*).

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MFC)

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe są urządzeniami, które wykorzystują mikroorganizmy do konwersji energii chemicznej zawartej w substancjach organicznych na energię elektryczną poprzez proces biologicznego utleniania [109]. W MFC mikroorganizmy, zwłaszcza elektroaktywne, katalizują utlenianie substratów organicznych na anodzie, uwalniając w ten sposób elektrony. Elektrony te są następnie przeniesione przez zewnętrzny obwód elektryczny na katodę, gdzie reagują z akceptorem elektronów, najczęściej tlenem, tworząc wodę lub inne produkty uboczne [109,127]. Podczas tego procesu generowana jest energia elektryczna, którą można wykorzystać do zasilania innych urządzeń. MFC są badane jako obiecująca technologia zrównoważonej produkcji energii ze szczególnym zastosowaniem w oczyszczaniu ścieków oraz w zastosowaniach związanych z odnawialnymi źródłami energii.

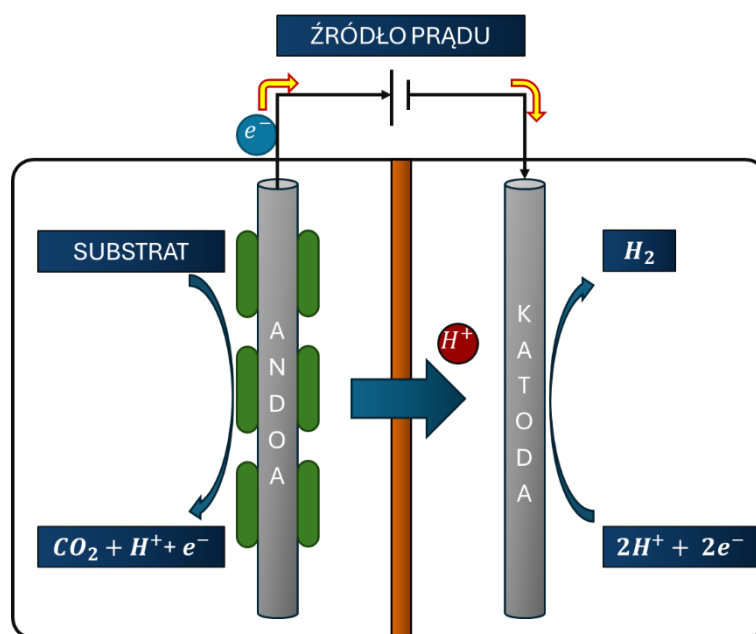


Rysunek 9 Budowa i zasada działania mikrobiologicznego ogniwa paliwowego w konfiguracji dwu- i jednokomorowej.

Produkcja energii elektrycznej w MFC jest zależna bezpośrednio od zdolności egzoelektrogenów (mikroorganizmów generujących energię elektryczną) obecnych na anodzie, do produkcji i transferu elektronów ze zredukowanego substratu do anody. Utlenianie złożonej materii organicznej w ściekach wymaga zróżnicowanych społeczności drobnoustrojów. Dziesiątki gatunków bakterii są w stanie wytwarzać prąd elektryczny, a najlepiej przebadanymi bakteriami zostały *Shewanella* i *Geobacter*. Stabilną produkcję prądu elektrycznego częściej obserwuje się w MFC z mieszanymi kulturami niż w ich odpowiednikach z pojedynczymi czystymi szczepami. Konsorcjum mieszane z bakteriami *Geobacter* w społeczności bioanod często wykazuje wysokie wartości generowanego prądu elektrycznego zarejestrowane w MFC w porównaniu do anod z biofilmem opartym na pojedynczym szczepie [128].

Mikrobiologiczne ogniwa elektrolityczne (MEC)

Mikrobiologiczne ogniwa elektrolityczne są układami, które mikroorganizmy wykorzystują do katalizowania reakcji elektrochemicznego rozkładu wody na wodór i tlen [115]. W przeciwieństwie do MFC katoda MEC działa w warunkach beztlenowych, które ułatwiają produkcję wodoru. Jednak środowisko beztlenowe w MEC, wraz z wysokimi stężeniami wytwarzanego wodoru, może również sprzyjać produkcji metanu, gdy dostępne są CO_2 i mikroorganizmy metanogenne. Niektóre z metod ograniczania produkcji metanu obejmują napowietrzanie komory katodowej, obniżanie pH, pracę przy krótkich czasach retencji i poddawanie inokulatu szokowi termicznemu lub dodawanie substancji chemicznych hamujących wzrost metanogenów [129]. Dodatkowo w MEC obserwowane są wyższe wartości prądu elektrycznego niż w MFC. Wynika to z faktu, że dodatkowe napięcie jest przykładane do systemu w celu zmiany równowagi układu na korzyść produkcji wodoru [130].



Rysunek 10 Schemat budowy i zasada działania mikrobiologicznego ogniwa elektrolizy.

Wodór wytwarzany w MEC może również zostać użyty do napędzenia innych reakcji chemicznych w celu wytworzenia nowych substancji. Najczęstszymi przykładami substancji produkowanych w MEC są: nadtlenek wodoru, powstający podczas reakcji redukcji tlenu wodorem, oraz metan i octan sodu podczas redukcji tlenku węgla IV [131].

4.3.4 Elementy budowy

Każdy element budowy układu bioelektrochemicznego ma znaczący wpływ na jego osiągi. Zrozumienie wpływu zastosowanego materiału na działanie układu jest bardzo ważnym kryterium, umożliwiającym pracę w celu optymalizacji osiągniętych wyników.

4.3.4.1 Elektroaktywny biofilm

Spółeczności drobnoustrojów tworzące elektroaktywny biofilm odgrywają istotną rolę w pracy układu bioelektrochemicznego. Dokładna liczba gatunków mikroorganizmów zdolnych do degradacji związków ropopochodnych nie jest jednoznacznie określona. Mikroorganizmy, takie jak *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Bacillus*, są głównymi gatunkami degradującymi związki ropopochodne w środowisku, a niektóre z nich są dodatkowo egzoelektrogenami [132]. Większość czystych kultur może metabolizować jedynie określone węglowodory. Dlatego mieszane społeczności drobnoustrojów mają większy potencjał skutecznego rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych. Przykładowo zaobserwowano, że konsorcjum składające się z *Acinetobacter* sp., *Kocuria* sp. i *Kineococcus* sp. zdegradowało 49,22 % wstępnie zadanych zanieczyszczeń ropopochodnych, co było wartością wyższą w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla tych samych bakterii rozwijanych pojedynczo [133]. W badaniu J. Chena i in. wykazano, że drobnoustroje autochtoniczne zazwyczaj skuteczniej radzą sobie z remediacją *in situ* niż drobnoustroje spoza danego środowiska. Ponadto opisano w nim zastosowanie bakterii *Bacillus* i *Pseudomonas* w procesach degradacji węglowodorów ropopochodnych i produkcji energii elektrycznej, zarówno w trakcie procesu remediacji, jak i w układach bioelektrochemicznych [133].

4.3.4.2 Materiały elektrodowe anod i katod

Elektrody służą jako podłoże do tworzenia biofilmu. Dlatego powinny być biokompatybilne, posiadać niskie opory wewnętrzne, nie korodować i być stabilne elektrochemicznie. Przed zastosowaniem danej elektrody konieczna jest analiza zalet i wad różnych materiałów i kosztów ich użycia.

Czas adaptacji mikroorganizmów do degradacji ropopochodnych w BES zależy od rodzaju materiału elektrody, roztworu soli mineralnych, pH, przewodności, stężenia tlenu i temperatury [134]. Dlatego też, aby zrozumieć proces bioelektrochemicznej remediacji, konieczne jest zbadanie zaawansowanych materiałów anodowych, które skutecznie wspierają aktywność drobnoustrojów, wykazując jednocześnie wysoką wydajność elektrochemiczną [135] i umożliwiając jego dalsze wdrażanie na dużą skalę [136,137].

Materiały stosowane jako anody w BES są ważnym obszarem badań. Typowe elektrody wykonane z materiałów węglowych wykazują doskonałe właściwości chemiczne i elektryczne oraz zapewniają podłoże do szybkiego przylegania bakterii, dzięki czemu mają szerokie zastosowanie w układach bioelektrochemicznych [138]. Materiały te są stosowane głównie w skali laboratoryjnej ze względu na ich kruchą strukturę i tendencję do gromadzenia się starych warstw biofilmu na ich powierzchni. Zjawisko to może prowadzić do wzrostu rezystancji omowej [139]. Elektrody metaliczne, takie jak metalowe płyty porowate lub elektrody z welny stalowej, mogą być stosowane jako alternatywny materiał anodowy [140]. Materiały te są strukturalnie mocniejsze niż ich węglowe odpowiedniki, co może ułatwić ich czyszczenie, modyfikację i recykling [141]. Ponadto materiały stalowe charakteryzują się niską rezystancją wewnętrzną, co nie tylko

zwiększa przepływ prądu, ale może również prowadzić do wzrostu mikroorganizmów elektrogennych.

Podczas eksperymentów chronoamperometrycznych, przeprowadzonych przez D. Pocaznoi'ego i in., przy zastosowanym potencjale +0,1V względem SCE dla materiału ze stali nierdzewnej zaobserwowano wyższą wartość gęstości prądu ($35 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$) w porównaniu do materiału grafitowego ($11 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$) [142]. W badaniu W. Chena i in. natomiast zmodyfikowana elektroda z filcu z włókien nierdzewnych z nanocząsteczkami Pd zastosowana w MFC uzyskała 2,79 razy dłuższy cykl i prawie tak dobre wyniki ($390,79 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) jak konwencjonalna elektroda Pd ($405,47 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$). [141]. Niemniej jednak, duża część badań nad elektrodami metalicznymi w BES przebiega przy zastosowaniu prostych substratów. Do tej pory nie opisano zastosowania elektrody metalicznej w układzie BES zasilanym ropą naftową. Jednak jej użycie mogłoby mieć pozytywny wpływ na długoterminowe właściwości układu. Wynika to z faktu, że związki ropopochodne, z natury hydrofobowe i często o wysokiej lepkości, mogą wchodzić w interakcje z materiałami węglowymi i blokować dostęp mikroorganizmów do powierzchni elektrody.

4.3.4.3 Membrany i separatory

Membrany i separatory to fizyczne i selektywne bariery wykorzystywane w procesach separacji. W układach BES zapobiegają bezpośredniemu kontaktowi elektrolitów znajdujących się w komorach anodowych i katodowych. Dzięki zdolności do selektywnego transportu protonów, membrany protonowymienne, takie jak Nafion®, są stosowane w BES. Mimo wysokiej przewodności elektronów, membrany te charakteryzują się wysokim kosztem [143]. Tańsze odpowiedniki separatorów mimo zadowalającej wydajności procesu transportu elektronów, dodatkowo uczestniczą w dyfuzji tlenu do komory anodowej, co zmniejsza efektywność układu [143].

Kolejne lata pracy nad układami bioelektrochemicznymi przyniosły alternatywne rozwiązania na przykład w postaci membran Zirfon® [144]. Wielu badaczy wykorzystuje również materiały o bardziej ogólnych właściwościach transportowych i niższej cenie, takich jak membrany jonowymienne [145], ceramiczne membrany [146], polimerowe separatory membranowe [147], membrany z włókien jedwabiu [148] i polistyren [149].

4.3.5 Pozostałe czynniki wpływające na wydajność BES

Na wydajność układów bioelektrochemicznych oraz degradowanych w nich zanieczyszczeń mogą mieć wpływ dodatkowe czynniki zewnętrzne. Są to czynniki abiotyczne, które obejmują różne aspekty środowiska, takie jak warunki fizykochemiczne. Do najważniejszych zaliczyć możemy pH roztworu soli mineralnych, temperaturę procesu i przewodność elektrolitu.

4.3.5.1 pH roztworu

Roztwór w reaktorze mikrobiologicznym, takim jak ściek lub osad, posiada opór wewnętrzny, który utrudnia przenoszenie protonów z anody do katody, powodując przy tym powstawanie gradientu pH. Optymalny zakres pH zapewnia biodostępność substratów, a tym samym ułatwia eliminację węglowodorów i produkcję energii elektrycznej. Odczyn pH o wartościach neutralnych jest zazwyczaj optymalny do wytwarzania energii elektrycznej, ponieważ zwiększa działanie bakterii elektrogennych. Na przykład pH równe 6,8 jest idealne dla bakterii *Geobacter*. Ponadto pH od 6,0 do 7,0 okazało się najkorzystniejszym przedziałem wartości w trakcie biodegradacji alkanów i WWA [150]. Badania H. Hassana i in. nad bakteriami z rodzaju *Bacillus subtilis* wykazały optymalne wartości degradacji chlorofenoli przy pH anolitu równym 7,5 oraz katolitu 6,6 [151]. W związku z tym różnice pomiędzy wartościami pH anody i katody mają wpływ na aktywność mikroorganizmów, a tym samym na rezystancję wewnętrzną układu [134]. Z tego powodu wartość pH elektrolitu powinna być stale monitorowana w trakcie przeprowadzanych badań.

4.3.5.2 Temperatura procesu

Temperatura jest istotnym parametrem wpływającym na kinetykę reakcji redoks przeprowadzanych przez mikroorganizmy. Niższe temperatury mogą znacząco spowalniać lub utrudniać prawidłowe działanie układu bioelektrochemicznego. Niższa temperatura wpływa negatywnie na rozwój społeczności drobnoustrojów oraz znacząco wydłuża czas rozpoczęcia efektywnego działania i zmniejsza wydajność BES. Zwiększenie produkcji energii następuje, gdy BES pracuje w wyższym zakresie temperaturowym (około 40°C). Dalszy wzrost temperatury nie wpływa jednak znacząco na otrzymywane wyniki [152].

Określony został zakres temperatury, przy którym obserwowany jest wzrost wydajności mikroorganizmów w BES. Temperatury w przedziale 35-40°C poprawiają wydajność systemu pod względem szybkości degradacji podłoża i wytwarzania energii elektrycznej [153]. W artykule O. Adelaja i in. opisano wpływ temperatury na degradację zanieczyszczeń ropopochodnych w zakresie 20-50°C. Potwierdzono w nim dwukrotnie większą szybkość degradacji w 40°C w porównaniu z 20°C. Dodatkowo uznano, że zbyt wysoka temperatura procesu (około 50°C) znacząco spowalnia proces degradacji [154].

4.3.5.3 Przewodność elektrolitu

Efektywność układów bioelektrochemicznych zależy również od procesu transportu elektronów. Zwiększenie powierzchni wymiany masy, wilgotności czy stopnia zasolenia to kilka sposobów na efektywniejszy proces transportu elektronów.

Materiały z włókna węglowego ułatwiają proces transportu elektronów, co sprzyja funkcjonowaniu mikroorganizmów elektrogennych. Natomiast BES wyposażony w elektrody z grafitu charakteryzuje się wyższą aktywnością mikrobiologiczną, a tym samym usuwaniem zanieczyszczeń niż ogniwo z anodą z włókna węglowego [155].

Wynika to z wyższej przewodności grafitu w porównaniu do włókna węglowego. Ponadto, gdy w BES zastosowano wodę gruntową lub osad zawierający zanieczyszczenia, takie jak azotany, siarczany lub tlenek metali, dodatkowe jony obecne w roztworze soli mineralnych (MSM z ang. *mineral salt medium*) odgrywały rolę akceptorów elektronów, zwiększając w ten sposób przewodność układu [154]. Zastosowanie odpowiedniego rodzaju i stężenia jonów w MSM w trakcie procesu degradacji węglowodorów ułatwia transfer elektronów, a tym samym produkcję energii elektrycznej. Zbyt duży wzrost zasolenia może mieć jednak negatywny wpływ na metabolizm drobnoustrojów. W badaniu X. Guo i in. opisano, że wyższe stężenie soli ($5,4$ i $6,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ma niekorzystny wpływ na działanie BES, podczas gdy optymalne zasolenie wynosi $4,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl [155].

4.3.6 Wpływ biosurfaktantów na wydajność energetyczną

Dodatek związków powierzchniowo czynnych może znacząco ułatwić transport elektronów w systemie oraz zwiększyć dostępność trudno rozpuszczalnych w wodzie związków. Komórka bakteryjna oddzielona jest od roztworu elektrolitu ścianą i błoną komórkową. Elementy te mogą wpływać zarówno na transport mediatorów, jak i samych elektronów z wnętrza komórki na zewnątrz. Zastosowanie środków powierzchniowo czynnych może wpłynąć na poprawę przepuszczalności membrany biologicznej, znacząco ułatwiając transport mediatorów w MET. W artykule G. Pasternaka i in. opisano wpływ środków powierzchniowo czynnych, takich jak ramnolipidy, Tween 80, SDS lub Triton X -100. Ich dodanie skutkowało zwiększeniem produkcji prądu elektrycznego w BES [156]. W badaniu Q. Wena i in. opisano zastosowanie dodatku niejonowego środka powierzchniowo czynnego w postaci Tween 80 w BES, który znacząco zwiększył wartości gęstości mocy z $21,5 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ do $187,0 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ [157]. Ponadto, w badaniu H.B. Shen i in, opisano, że dodatek surfaktantu może zmniejszyć rezystancję wewnętrzną ogniwa. Dodatek lipidu trehalozy zmniejszył opór wewnętrzny o około 43 % w MFC [158].

Niekorzystne warunki panujące w BES mogą utrudnić powstawanie elektroaktywnego biofilmu. W pracy T. Zhenga i in. wskazano, że nadprodukcja ramnolipidów spowodowała spowolnienie tworzenia biofilmu przez *P. aeruginosa* PAO1 w płytce 96-dołkowej [159]. Zjawisko to można wyjaśnić amfifilową naturą biosurfaktantów, które ułatwiają przyczepianie się hydrofilowej komórki bakteryjnej do hydrofobowego podłoża. Ten sam efekt może zatem wystąpić na powierzchni elektrody, w szczególności na hydrofobowych materiałach na bazie węgla. W artykule Y. Zhanga i in. opisano wpływ stężenia biosurfaktantów na grubość powstałego biofilmu. Dodanie 40, 80 i $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ramnolipidów spowodowało, że grubość biofilmu wzrastała i wynosiła odpowiednio 2,03; 6,14 i 4,14 μm [160].

4.3.7 Zastosowanie układów bioelektrochemicznych w bioremediacji

Badania przeprowadzone w minionej dekadzie miały na celu sprawdzenie możliwości wykorzystania układów bioelektrochemicznych do degradacji zanieczyszczeń oraz porównanie ich z tradycyjnymi metodami remediacji. Poniżej opisano wybrane z nich.

Oczyszczanie wody

Problem zanieczyszczenia wody węglowodorami jest zwykle spowodowany wyciekami z kontenerów, statków i platform wiertniczych. Zbadano układy jedno- i dwukomorowych MFC, które wytwarzały energię elektryczną wykorzystując węglowodory jako substraty. Węglowodory te rozpuszczone były w wodzie gruntowej zubożonej o tlen. Z danych przedstawionych w artykule Y. Zhanga i in. wynika, że technologia MFC umożliwia rekultywację wód gruntowych w warunkach beztlenowych *in situ* [160]. W 2009 roku w pracy J.M. Morris i in. opisano zastosowany dwukomorowy układ pod kątem biodegradacji związków zawartych w komercyjnie dostępnym oleju napędowym (roztwór zawierał mieszaninę węglowodorów C8–C25) w wodzie. Wyniki wskazywały na zwiększenie biodegradacji o 165 % w ciągu 21 dni w porównaniu z kontrolą bez podłączenia elektrod do zewnętrznego obwodu elektrycznego [161]. Zastosowane w pracy E. Gambino i in. jednokomorowe ogniwo z katodą powietrzną wykorzystano w celu intensyfikacji degradacji WWA w środowisku wodnym, co spowodowało 90 % spadek stężenia tych związków [162]. W literaturze wykazano również, że układy bioelektrochemiczne nie tylko mogą skrócić znacząco czas degradacji ropopochodnych w roztworach wodnych, ale również są skutecznym narzędziem w degradacji szerokiej gamy zanieczyszczeń [134].

Oczyszczanie gleby z węglowodorów

Węglowodory wpływają na środowisko glebowe głównie poprzez zmianę składu i struktury gleby, zakłócanie wzrostu roślin i zmienianie społeczności drobnoustrojów glebowych. Układy bioelektrochemiczne, a w szczególności mikrobiologiczne ogniwa paliwowe, były stosowane w ostatnich latach w celu zmniejszenia zanieczyszczenia gleby węglowodorami.

MFC w kształcie U-rurki wypełnione glebą zostało zbadane pod kątem degradacji związków ropopochodnych. Celem badania było określenie maksymalnej odległości od anody, przy której można zaobserwować degradację zanieczyszczeń. W badaniu X. Wanga i in. osiągnięto zwiększenie usuwania TPH o 120 % w promieniu anody (<1 cm) w ciągu 25 dni. Mała wilgotność gleby lub większe odległości od anody były czynnikami limitującymi proces [163]. Za to w badaniu L. Lua i in. podjęto próbę zwiększenia zasięgu degradacji węglowodorów od anody w układzie o skali pilotażowej. Konstrukcja kolumnowa działała efektywnie w bezpośrednim sąsiedztwie elektrody, zwiększając obszar degradacji i skracając czas remediacji. Wykazano, że promień oddziaływania takiego układu może sięgać od 90 do 300 cm, co oznacza 11-12-krotność promienia elektrody [164].

W wielu procesach bioremediacji degradacja związków ropopochodnych jest ograniczona przez niską aktywność mikroorganizmów i słaby transfer elektronów. W badaniach X. Lia i in. analizowano wpływ kosubstratu na biodegradację w mikrobiologicznym ogniwie paliwowym zawierającym zasoloną glebę zanieczyszczoną węglowodorami. Badania te wykazały wzrost aktywności mikrobiologicznej drobnoustrojów, co przełożyło się na zwiększenie usuwania TPH [165]. Dodatkowo w badaniu Y. Zhaoa i in. sprawdzono wpływ czterech rodzajów środków powierzchniowo czynnych: anionowego, kationowego, niejonowego i amfoterycznego na degradację związków ropopochodnych. Wykazano, że dodatek amfoterycznego związku powierzchniowo czynnego skutkował wzrostem degradacji węglowodorów i wytwarzania prądu elektrycznego w badanym MFC [166].

Modyfikacja parametrów gleby również może mieć wpływ na proces. W pracy X. Li i in. zbadano wpływ dodatku piasku na transport masy w glebowych MFC. Zmiana składu gleby skutkowałą zwiększeniem porowatości gleby od 45 do 51 %, przy jednoczesnym zmniejszeniu oporów omowych o 46 %. Proces ten prowadził do zwiększenia wydajności układu, co pozwoliło na przyspieszenie procesu degradacji węglowodorów [167]. Gleby zasolone stanowią około 40 % powierzchni ziemi. W pracy X. Li i in. opisano laboratoryjny system rekultywacji zasolonych gleb alkalicznych i zasolonych zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi. Przebadano wpływ ekstremalnego zasolenia w glebie zmieszanej z włóknem węglowym. System ten charakteryzował się przyspieszonym tempem degradacji TPH, WWA i n-alkanów [168].

W badaniu Y. Zhanga i in. określono wpływ położenia anody na wydajność układu bioelektrochemicznego, wykorzystując dwa różne położenia anod (poziome oraz pionowe). Zwiększoną wydajność procesu usuwania węglowodorów uzyskano stosując konfigurację z anodami ułożonymi poziomo, która usunęła o około 50 % więcej TPH niż reaktor ustawiony pionowo [169]. Wyniki otrzymane przez A. de Rosset i in., również potwierdziły pozytywny wpływ zastosowania układu horyzontalnego w procesie usuwania zanieczyszczeń. W pracy tej wykorzystano hydrofobowy substrat w postaci oleju posmażalniczego zawierającego kwasy tłuszczowe [112].

Oczyszczanie gleby z metali ciężkich

Układy bioelektrochemiczne stosuje się także do usuwania i odzyskiwania metali z odcieków i ścieków wytworzonych w trakcie procesów górniczych i metalurgicznych. To podejście korzystnie wpływa na proces odzysku cennych metali szlachetnych, które mogą posłużyć do ponownego zastosowania. W pracy H. Wanga i in. opisano proces redukcji elektrochemicznej miedzi w BES z wykorzystaniem mikroorganizmów elektroaktywnych. W układzie odnotowano produkcję prądu elektrycznego (wyliczona wartość gęstości mocy $2250 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-3}$ oraz gęstości prądu $10,65 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$), przy jednoczesnej redukcji jonów miedzi do miedzi metalicznej [170]. W badaniu B. Zhang i in. zastosowano układ bioelektrochemiczny w postaci dwukomorowego MFC zasilanego ściekami przemysłowymi, w procesie odzysku jonów wanadu i chromu. Otrzymana maksymalna wartość gęstości mocy tych układów wyniosła $970 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ i wykazała zwiększoną skuteczność redukcji elektrody dzięki zastosowaniu razem dwóch

akceptorów elektronów V^{5+} i Cr^{6+} [171]. W pracy L. Szydłowskiego i in. wykorzystano BES do zweryfikowania społeczności drobnoustrojów z czterech odwodnień kopalnianych pod kątem ich zdolności do usuwania miedzi (Cu). Układ 96-dołkowych mikrobiologicznych ogniw paliwowych osiągnął maksymalną wartość gęstości mocy równą 445 mWm^{-3} i wykazał redukcję jonów Cu^{2+} do miedzi metalicznej [172].

Oczyszczanie zanieczyszczonej gleby pestycydami i antybiotykami

BES wykorzystano również do odzyskiwania amoniaku (NH_4^+) z moczu. W eksperymencie P. Kuntke'ego i in. elektrony potrzebne do migracji NH_4^+ z anody do katody były generowane przez bakterie anodowe w wyniku utleniania materii organicznej. Szybkość odzysku amonu i gęstość prądu zarejestrowano odpowiednio jako $3,29 \text{ kJ} \cdot \text{g} \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ i $0,50 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ (w stosunku do pola powierzchni membrany), a w procesie uzyskano nadwyżkę energii w wysokości $3,46 \text{ kJ} \cdot \text{g} \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, co stanowiło więcej niż energia wymagana do odzyskiwania amoniaku przez metodę odpędzania tego związku za pomocą przedmuchu gazem obojętnym [173]. W artykule P. Ledezmana i in. zwrócono uwagę, że nie tylko związki azotu można odzyskać przy użyciu technologii BES. Fosfor i potas są pierwiastkami dobrze usuwalnymi z roztworów. Jednak jony fosforanowe (PO_4^{3-}) oraz potasowe (K^+) odkładane są w procesach elektrolitycznych na powierzchni elektrody. Zjawisko to wpływa negatywnie na wydajność procesu elektrochemicznego, a przez to znacząco utrudnia proces odzyskiwania tych pierwiastków [174].

V. Cele i zakres pracy

Głównym celem rozprawy doktorskiej była ocena możliwości zastosowania układów bioelektrochemicznych w procesie degradacji związków ropopochodnych przy jednoczesnej produkcji związków powierzchniowo czynnych. Zakłada się, że odpowiedni dobór parametrów procesu oraz materiałów użytych do konstrukcji układów BES może pozytywnie wpłynąć na aktywność mikrobiologiczną, a w konsekwencji na zwiększenie produkcji prądu elektrycznego oraz przyspieszenie procesu biodegradacji związków ropopochodnych.

Dodatkowo postawiono cztery szczegółowe cele badawcze. Pierwszym z nich była identyfikacja materiałów anodowych sprzyjających wydajnej produkcji prądu w bioelektrochemicznych systemach zasilanych substratami ropopochodnymi. Materiały anodowe promujące proces tworzenia się stabilnego i gęstego biofilmu elektroaktywnego mogą znacząco zwiększyć produkcję prądu w układach BES, nawet przy wykorzystaniu wyłącznie substratów ropopochodnych.

Drugim celem rozprawy była ocena wpływu zastosowania kosubstratu (octanu sodu) na wydajność procesów redoks oraz wydajność degradacji związków ropopochodnych w BES. Dodatek prostego źródła węgla może zwiększyć początkową aktywność mikroorganizmów i produkcję prądu, co w dłuższym okresie powinno pozytywnie wpłynąć na degradację związków ropopochodnych.

Następnym celem było zbadanie jakości mikrobiologicznego konsorcjum oraz jego roli w procesie biodegradacji związków ropopochodnych w BES. Wyższa różnorodność mikroorganizmów tworzących biofilm anodowy skutkuje bardziej efektywną degradacją tych związków. Może to wynikać z obecności mikroorganizmów zdolnych do produkcji biosurfaktantów. Związki te znacząco zwiększają wydajność transportu elektronów i dostępność do hydrofobowych substratów.

Ostatnim szczegółowym celem pracy była identyfikacja substancji powstających w układach bioelektrochemicznych oraz ocena ich wpływu na funkcjonowanie BES. Zakłada się, że w procesie degradacji związków ropopochodnych produkowane są biosurfaktanty, których zadaniem jest obniżenie napięcia powierzchniowego oraz zwiększenie biodostępności substratów. Związki te dodatkowo wspomagają proces degradacji związków ropopochodnych. Przyjęto również, że konsorcja mikroorganizmów, pochodzące ze środowiska naturalnego, zawierają gatunki zdolne do syntezy biosurfaktantów.

W pracy skoncentrowano się na zastosowaniu różnych układów bioelektrochemicznych jako innowacyjnej platformy wspomagającej procesy bioremediacji. Układy te dodatkowo zdolne były do produkcji prądu elektrycznego. Efektywność tych układów określono poprzez pomiary elektrochemiczne (pomiary produkcji prądu elektrycznego w czasie rzeczywistym, chronoamperometria, woltamperometria liniowa, woltamperometria cykliczna, elektrochemiczna impedancja spektroskopii), analizę składu chemicznego (GC-MS), analizę morfologiczną struktury biofilmu (SEM, FM)

oraz badania występowania biosurfaktantów (pomiar napięcia powierzchniowego, kąta zwilżania, analiza LC-MS otrzymanych produktów).

By osiągnąć cele rozprawy doktorskiej, przeprowadzono szereg badań polegających na:

- Określeniu wpływu parametrów, takich jak potencjał elektrody, na wydajność procesu wzbogacania elektroaktywnego biofilmu;
- Wykazaniu zależności bioróżnorodności mikrobiologicznej na produkcję prądu oraz degradację związków ropopochodnych;
- Zbadaniu wybranych materiałów elektrodowych oraz określeniu ich wpływu na wydajność produkcji prądu elektrycznego;
- Określeniu wpływu octanu sodu jako kosubstratu oraz enzymu lakazy na efektywność procesu degradacji związków ropopochodnych;
- Przebadaniu dziewięciu konsorcjów mikrobiologicznych (konsorcja gleb antropogenicznych, azjatyckich oraz cieków wodnych) pod kątem produkcji prądu elektrycznego oraz potencjalnej produkcji związków powierzchniowo czynnych;
- Zbadaniu długoterminowej wydajności produkcji prądu elektrycznego, degradacji związków ropopochodnych oraz określeniu rodzaju produkowanych biosurfaktantów w trakcie procesu degradacji związków ropopochodnych.

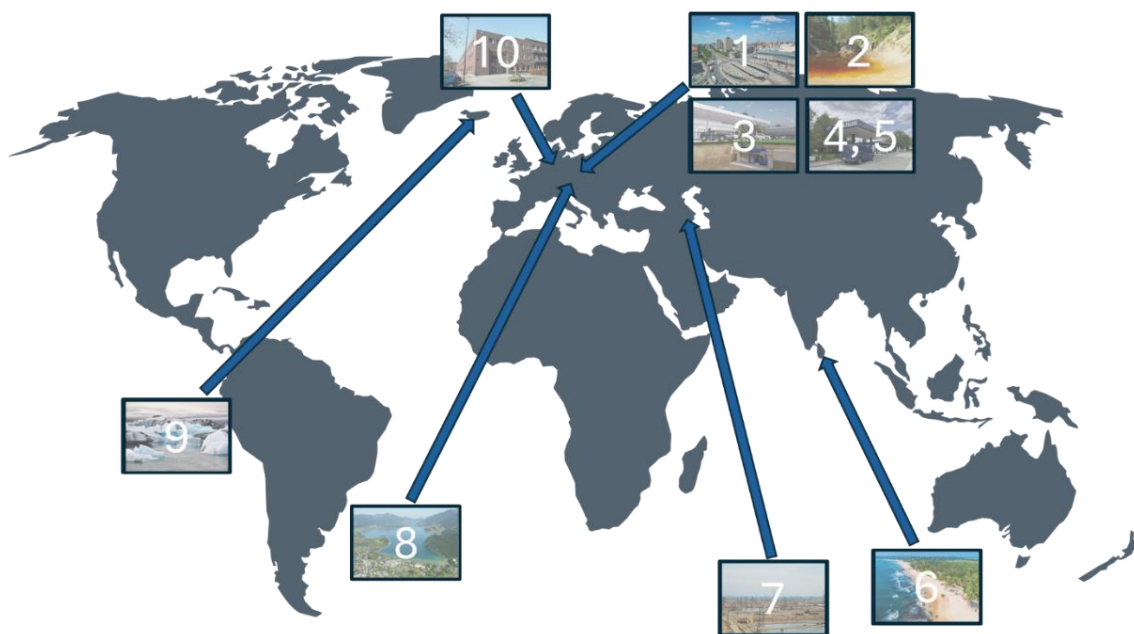
Przedstawione w rozprawie wyniki badań mogą przyczynić się do dalszego rozwoju dziedziny projektowania i wykorzystywania układów bioelektrochemicznych w procesach bioremediacji związków ropopochodnych. Dodatkowo zaprezentowane wyniki i wnioski mogą posłużyć do głębszego zrozumienia procesu stymulacji biosyntezy surfaktantów w układach BES w celu intensyfikacji bioremediacji.

VI. Metodyka badawcza

6.1 Środowiska mikrobiologiczne

Mikroorganizmy użyte w eksperymentach pozyskane zostały w ramach wcześniejszych prac kierownika Laboratorium Mikrobiologicznych Układów Elektrochemicznych z terenów o zróżnicowanym stopniu zanieczyszczenia związkami ropopochodnymi. Na rysunku 11 oraz odpowiadającej mu tabeli 2 przedstawiono lokalizacje, z których pozyskano próbki środowiskowe do badań.

Próbki gleby zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi zostały pobrane z głębokości od 5 do 10 cm pod powierzchnią gleby. Przechowywano je w hermeticznie zamkniętych plastikowych pojemnikach, transportowanych bezpośrednio do laboratorium. Próbki zagraniczne pochodziły z roku 2014 lub lat wcześniejszych. Były zamrożone przy użyciu roztworu dimetylosulfotlenku (DMSO, stężenie 0,1 % w MSM) lub glicerolu (stężenie 50 % w MSM), w temperaturze -80°C do czasu wykonywania badań. Na krótko przed użyciem próbki gleby były przechowywane w temperaturze 4°C oraz przepuszczone przez 2-milimetrowe sito w celu usunięcia korzeni roślin i skał. Próbki gleby przed zastosowaniem zostały doprowadzone do temperatury pokojowej wynoszącej 25°C .



Rysunek 11 Miejsca pozyskania materiału do badań naniesionych na konturową mapę świata. Numerami oznaczono lokalizacje poboru próbek, których opis przedstawiono w tabeli 2. Zdjęcia lokalizacji pozyskane z Google Maps oraz Google Grafika, licencjonowane na zasadach open source.

Tabela 2 Wykaz miejsc pozyskania materiałów do badań.

LP	Lokalizacja próbki środowiskowej
1.	Próbka gleby z okolic publicznego parkingu na obszarze miejskim Wrocławia (woj. Dolnośląskie, Polska)
2.	Osad oraz próbki wodne z „żółtego jeziora” (woj. Dolnośląskie, Polska)
3.	Szlam, osad, próbki gleby z separatora ropopochodnych stacji paliw (woj. Kujawsko-Pomorskie, Polska)
4.	Gleba z okolicy skrzynki rozładunku paliwa stacji paliw (woj. Kujawsko-Pomorskie, Polska)
5.	Osad, próbki gleby z kanału ściekowego stacji paliw (woj. Kujawsko-Pomorskie, Polska)
6.	Próbka gleby ze Sri Lanki (Sri Lanka)
7.	Próbki gleby z okolicy wulkanu błotnego z Azerbejdżanu (Azerbejdżan)
8.	Osad oraz próbki wodne z ciekłu górskiego poniżej lodowca Engelberg (Austria)
9.	Próbki wodne z lodowca (Austria)
10.	Próbki mikroorganizmów z zasobów Uniwersytetu w Bremie (Brema, Niemcy)

6.2 Skład pożywek mikrobiologicznych

Skład mineralnej pożywki solnej stosowanej w komorach anodowych był następujący:

- NH_4Cl (Chempur, Polska) w zakresie od $0,5$ do $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;
- Na_2HPO_4 (POCH, Polska) $0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;
- KCl (POCH, Polska) $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;
- NaHCO_3 (Chempur, Polska) $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;
- roztwór pierwiastków śladowych o stężeniu $10 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$;
- jako źródło węgla wykorzystano komercyjnie dostępny olej napędowy, próbki ropy naftowej pozyskane z terenów kopalni ropy naftowej w Bóbrce octan sodu $\text{CH}_3\text{COOH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Chempur, Polska) $0,82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

pH roztworu było równe 7,5. Wszystkie roztwory zostały przygotowane przy użyciu wody dejonizowanej Milli-Q i autoklawowane przed użyciem (w 121°C przez 20 min). Substancje chemiczne i odczynniki wykorzystane przy realizacji badań uzyskano od Sigma Aldrich (USA), Carl Roth (Niemcy), Chempur (Polska). Wszystkie chemikalia były klasy analitycznej ($\geq 99\%$ czystość) i stosowane bez dodatkowego oczyszczania.

6.3 Użyte materiały i konfiguracja reaktorów

Na potrzeby prac opisanych w rozdziale 7. niniejszej rozprawy (*Wyniki i dyskusja*) zaprojektowano i skonstruowano specjalne układy BES. Elementy budowy ogniów bioelektrochemicznych zaprojektowano w programach 3D Autodesk Inventor (Autodesk) lub DesignSpark (RS Components), a następnie wydrukowano na drukarce 3D (MK3S+, Prusa) lub wycięto przy pomocy plotera laserowego. W celu uszczelnienia ogniów wykorzystano uszczelki gumowe lub silikon. W tabeli 3 przedstawiono spis użytych komponentów przy konstrukcji poszczególnych ogniów. Schematy zastosowanych układów bioelektrochemicznych wraz z warunkami pracy ogniów przedstawiono bezpośrednio przy opisie danego eksperymentu.

Tabela 3 Zestawienie materiałów użytych w trakcie eksperymentów.

Element budowy	Nazwa materiału/układu	Firma i kraj pochodzenia	Użycie w pracy
Rodzaj układu elektrochemicznego	Jednokomorowe ogniwo z katodą powietrzną z ciągłym mieszaniem	Politechnika Wrocławska, Polska	7.1
	Bateryjny szklany reaktor	Politechnika Wrocławska, Polska	7.2
	Jednokomorowe ogniwo z katodą powietrzną	Uniwersytet w Bremie, Niemcy	7.3
	Jednokomorowe ogniwo z dwoma katodami powietrznymi	Politechnika Wrocławska, Polska	7.4
Materiał ogniwa	Polipropylen	Fiberlogy, Polska	7.1; 7.2; 7.3
	Szkło	Uniwersytet w Bremie, Niemcy	7.2
	Szkło akrylowe (PMMA)	FolPlex, Polska	7.4
Anoda	Welon węglowy	PRF Composite Materials, Wielka Brytania	7.1; 7.2; 7.3; 7.4
	Folc grafitowy	SGL Carbon, Niemcy	7.2
	Węlna ze stali nierdzewnej	RAKSO, Niemcy	7.2
Katoda	Węgiel aktywny CWZ-22	Stanlab, Polska	7.1; 7.3; 7.4
	Platynowa płytka	Goodfellow, Niemcy	7.2
Membrana	Membrana kationowymienna CMI-7000	USA	7.1; 7.3; 7.4

6.4 Pomiary elektrochemiczne

Wydajność układów bioelektrochemicznych we wszystkich badaniach była oceniana na podstawie pomiarów elektrochemicznych. Podstawowym pomiarem wykonywanym w trakcie badań był pomiar napięcia ogniwa w czasie rzeczywistym dokonywanym przez system akwizycji danych DAQ970A firmy Keysight. Pomiary wykonywane były w odstępach trzyminutowych przez cały okres prowadzenia eksperymentów. W trakcie badań używano dodatkowo takich technik jak woltamperometria liniowa i cykliczna, elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna oraz chronoamperometria.

6.4.1 Woltamperometria liniowa

W celu zbadania wydajności układów bioelektrochemicznych przeprowadzono pomiary woltamperometrii liniowej. Badania tą techniką przeprowadzono od potencjału obwodu otwartego (OCP z ang. *open circuit potential*) do 0 V względem elektrody referencyjnej (Ag/AgCl lub SCE) przy szybkości skanowania $1 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Wyniki badań przeanalizowano przy użyciu oprogramowania MultiTrace 4,5 (PalmSens, Holandia).

Natężenie prądu (I-Amper) obliczono zgodnie z prawem Ohma:

$$I = \frac{U}{R}$$

Gdzie: U – zmierzone napięcie (V – Volt), R – znana rezystancja zewnętrzna (Ω – ohm). Gęstość prądu ($\text{mA} \cdot \text{m}^{-2}$) została przeliczona na powierzchnię anody.

Moc ogniwa, P (W – Wat) obliczono na podstawie wzoru:

$$P = \frac{U^2}{R}$$

Gęstość mocy ($\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$) została obliczona jako iloraz kwadratu napięcia do rezystancji zewnętrznej oraz odwrotności powierzchni anody.

Wartość maksymalnego natężenia prądu i odpowiadającego mu napięciu ogniwa była wykorzystywana do obliczania optymalnej wewnętrznej rezystancji ogniwa (R_{wew}) na podstawie, której ustawiano rezystancję zewnętrzną (R_{zew}).

6.4.2 Woltamperometria cykliczna

Aktywność elektrochemiczna biofilmu została zbadana za pomocą woltamperometrii cyklicznej przy użyciu wielokanałowego potencjostatu MultiPalmSens 4 (PalmSens, Holandia) lub jednokanałowego potencjostatu Interface 1010T (Gamry Instruments, Niemcy). W zależności od eksperymentu, badania przeprowadzano w przedziale od -600 do +600 mV (kontra elektroda odniesienia Ag/AgCl lub SCE), przy szybkości skanowania $1 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Wszystkie badania woltamperometrii liniowej przeprowadzono w temperaturze 25 °C, chyba że określono inaczej. Wyniki badań przeanalizowano przy użyciu oprogramowania MultiTrace 4,5 (PalmSens, Holandia).

6.4.3 Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna

Analiza elektrochemicznej spektroskopii impedancji została wykorzystana do określenia rodzajów oporów wewnętrznych w testowanych układach bioelektrochemicznych. Pomiar przeprowadzono w konfiguracji dwuelektrodowej i trójelektrodowej. Konfiguracja dwuelektrodowa składała się z elektrody roboczej (anoda) i katody działającej zarówno jako przeciwelektroda, jak i elektroda odniesienia. Konfiguracja trójelektrodowa wykorzystywała dodatkową elektrodę odniesienia (Ag/AgCl lub SCE w zależności od eksperymentu) zanurzoną w roztworze elektrolitu. Program został skonfigurowany do skanowania częstotliwości od 1 mHz do 1 MHz przy amplitudzie ± 10 mV, a pomiary wykonano przy użyciu wielokanałowego potencjostatu MultiPalmSens 4 (PalmSens, Holandia). Dane przeanalizowano przy użyciu oprogramowania MultiTrace 4,5 (PalmSens, Holandia) oraz programu EC Lab (BioLogic, Francja). Układ zastępczy dobrano na podstawie badań N. Sekara i in. [175].

6.4.4 Chronoamperometria

W celu wzbogacenia elektroaktywnego biofilmu na elektrodzie pracującej zastosowano technikę chronoamperometrii [176]. W zależności od eksperymentu stały potencjał o różnej wartości był nadawany na elektrodę pracującą. Technikę tę przeprowadzono w układzie trójelektrodowym, gdzie: elektrodą pracującą była anoda, przeciwelektrodą była katoda, a trzecią elektrodą była elektroda referencyjna (Ag/AgCl lub SCE w zależności od eksperymentu). Pomiar natężenia prądu mierzony był w odstępach trzuminutowych przy pomocy użyciu wielokanałowego potencjostatu MultiPalmSens 4 (PalmSens, Holandia) lub jednokanałowego potencjostatu Interface 1010T (Gamry Instruments, Niemcy).

6.4.5 Pomiary napięcia ogniwa w czasie rzeczywistym

Podstawowym pomiarem wykonywanym w trakcie eksperymentów był pomiar napięcia ogniwa w czasie rzeczywistym. Pomiary te były realizowane za pomocą zewnętrznego systemu akwizycji danych DAQ970A (Keysight, USA) w trzuminutowych interwałach, co zapewniało precyzyjne monitorowanie dynamiki zmian napięcia. Zebrane dane stanowiły podstawę do późniejszych obliczeń wartości gęstości mocy.

Obliczenia mocy ogniwa przeprowadzono przy wykorzystaniu prawa Ohma, które zostało szczegółowo omówione we wcześniejszej części rozdziału. Prawo to, określające związek między napięciem, natężeniem prądu a rezystancją, pozwoliło na precyzyjne przekształcenie zmierzonych wartości napięcia na odpowiadające im wartości gęstości mocy. Takie podejście umożliwiło ocenę wydajności ogniwa w różnych fazach eksperymentu oraz analizę jego zdolności do konwersji energii chemicznej zanieczyszczeń na energię elektryczną.

6.5 Badanie występowania biosurfaktantów

6.5.1 Pęcherzykowe pomiary napięcia powierzchniowego

Napięcie powierzchniowe (ST z ang. *surface tension*) anolitu mierzono za pomocą tensjometru (Krüss BPT Mobile, Niemcy). Wszystkie pomiary przeprowadzono w temperaturze 25°C. Badania przeprowadzono z zastosowaniem metody dynamicznej i statycznej. Metoda dynamiczna składała się z serii pomiarów napięcia powierzchniowego w zależności od wieku pęcherzyków, obejmującego przedziały czasowe od 10 do 15 000 ms. Metoda statyczna obejmowała pomiar dla pęcherzyka o ustalonym wieku równym 11 000 ms. Spadki napięcia powierzchniowego sprawdzano względem wody destylowanej Mili-Q i świeżego niezaszczepionego MSM (72 mN·m⁻¹). Pomiar został powtórzony trzykrotnie, a z uzyskanych wyników obliczono wartość średniego napięcia powierzchniowego wraz z odpowiadającym mu odchyleniem standardowym. Otrzymane wyniki porównano względem przygotowanej krzywej wzorcowej dla różnych stężeń biosurfaktantów w postaci mieszaniny ramnolipidów. Krzywa ta umożliwiła oszacowanie stężenia biosurfaktantów w badanych roztworach.

6.5.2 Pomiar kąta zwilżania

Pomiar kąta zwilżania zastosowano w celu potwierdzenia obecności biosurfaktantów w roztworze anolitu. Pomiar wykonano na hydrofobowej silikonowej płytce, na której umieszczono kroplę roztworu anolitu przy pomocy igły. W celu wykluczenia błędów pomiary były powtarzane trzykrotnie, a następnie obliczano z nich średni kąt zwilżania. Wszystkie pomiary przeprowadzono w temperaturze 25°C. Otrzymane wyniki porównano z kontrolą wody destylowanej i świeżego niezaszczepionego MSM.



Rysunek 12 Kształt kropli anolitu w zależności od występowania biosurfaktantów i ich stężenia.

6.5.1 Analiza otrzymanych próbek biosurfaktantów

Przygotowanie próbki do ekstrakcji biosurfaktantów

W celu późniejszej analizy biosurfaktantów przeprowadzono proces wytrącania kwasem i ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym. Komórki bakteryjne oddzielono od anolitu poprzez wirowanie 6 000 obrotów/minutę przez 15 minut w temperaturze 25°C (Beckman Coulter, JLA-16,250 rotor, USA), a następnie otrzymany supernatant dodatkowo przefiltrowano sterylnym filtrem strzykawkowym o średnicy porów 0,22 µm.

Tak przygotowany roztwór biosurfaktantów poddano precypitacji kwasem solnym i ekstrakcji w wyparce próżniowej lub ekstrakcji do fazy stałej.

Precypitacja kwasem solnym i ekstrakcja w wyparce próżniowej

Pozbawiony komórek supernatant zakwaszono do pH 2,0 przy użyciu roztworu 1 M HCl (kwasu solnego). Tak otrzymany roztwór umieszczono w lodówce w temperaturze 4°C na 24 godziny w celu wytrącenia biosurfaktantów. Roztwór z niewielką zawartością osadu ekstrahowano trzykrotnie octanem etylu w proporcji 1:1 przez 5 minut, każdorazowo zbierając nową porcję fazy organicznej. W celu odparowania rozpuszczalnika organicznego z ekstraktu użyto wyparki próżniowej (Heidolph, Hei-VAP Advantage, Niemcy). Proces odparowania prowadzono w temperaturze 60°C z prędkością 60 obrotów/minutę. Ekstrakt odparowano do sucha, a następnie rozpuszczono w czystej porcji octanu etylu.

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Podczas ekstrakcji do fazy stałej (SPE z ang. *solid phase extraction*) wykorzystano wkłady C18 (CHROMABOND; objętość 3 ml; masa adsorbentu 500 mg). Kolumnę kondycjonowano 15 ml acetonitrylu, 3 ml metanolu i 3 ml dejonizowanej wody nadawanymi na kolumnę bezpośrednio po sobie. Następnie zadano 130 ml próbki na kolumnę. Po procesie ekstrakcji kolumnę przepłukano 3 ml wody i suszono ją przez 10 minut. Tak przygotowaną kolumnę z adsorbowanymi produktami przepłukano ponownie przy użyciu 3 ml acetonitrylu. Roztworzony produkt odparowano do sucha z rozpuszczalnika organicznego w temperaturze 40°C pod wyciągiem.

Analiza LC-MS/MS

Biosurfaktanty w stałej i wysuszonej formie rozpuszczono w 150 µl wodnego 5 mM buforu mrówczanu amonu i acetonitrylu w proporcji objętościowej 60/40. Próbkę następnie rozcieńczono 100-krotnie i przeanalizowano metodą LC-MS/MS. Charakterystykę produktów przeprowadzono przy użyciu Synapt G2 Si Q-TOF MS wyposażonego w źródło jonów elektrorozpylania (ESI) w połączeniu z systemem chromatograficznym Acquity UPLC I-class (Waters, USA). Do rozdzielania związków zastosowano chromatografię w odwróconym układzie faz na kolumnie ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1 × 100 mm). Fazy ruchome składały się z 10 mM mrówczanu amonu w wodzie w proporcji 5:95 (A) i 10 mM mrówczanu amonu w wodzie w proporcji 95:5 (B). Szybkość przepływu ustawiono na 0,300 ml·min⁻¹ przy całkowitym czasie pracy wynoszącym 6,5 min. Elucję liniową przeprowadzono w następujący sposób: 1,00 min – 20 % B; 2,50 min – 90 % B; 4,50 min – 90 % B; 4,60 min – 20 % B; 6,50 min – 20 % B. Temperatury próbki i kolumny ustawiono odpowiednio na 10°C i 45°C. Objętość wtrysku ustawiono na 2,00 µL. Akwizycję danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania MassLynx (wersja 4,1, SCN932, Waters, USA). Próbki badano w trybie jonów ujemnych. Parametry źródła jonów MS ustawiono następująco: napięcie kapilary – 2,50 kV; stożek próbkujący – 40 V; temperatura źródła – 130°C; temperatura desolwatacji – 450°C; przepływ gazu desolwatacyjnego – 800 L·h⁻¹ i przepływ gazu stożkowego – 60 L·h⁻¹.

6.6 Analiza składu chemicznego

6.6.1 Chemiczne zapotrzebowanie tlenu (ChZT)

Chemiczne zapotrzebowanie tlenu (ChZT) próbek zostało określone przy użyciu testów kuwetowych o zakresie 150-1000 mg·L⁻¹ O₂ (Hach-Lange, Niemcy) zgodnie z procedurą przygotowaną przez producenta. Ubytek ChZT został wyliczony jako:

$$R_{ChZT} = \frac{ChZT_p - ChZT_k}{ChZT_p} \cdot 100 \%$$

Gdzie: $ChZT_p$ – wartość zadana ChZT ; $ChZT_k$ – wartość otrzymana po procesie degradacji.

Wydajność kulombowską (CE z ang. *coulombic efficiency*), zwaną również sprawnością faradyczną lub sprawnością prądową, stosuje się do opisu sprawności konwersji biomasy na ładunek elektryczny w układach bioelektrochemicznych. Parametr ten został obliczony na podstawie uzyskanych wyników pomiarów ChZT i posłużył do określenia wydajności procesu biotransformacji związków ropopochodnych na energię elektryczną. Wydajność kulombowską obliczono dla złożonego substratu w układzie wsadowym zgodnie ze wzorem [119]:

$$CE = \frac{8 \cdot \int_0^t I dt}{F \cdot V_{AN} \cdot \Delta ChZT}$$

Gdzie: 8 – stała, oparta na masie cząsteczkowej tlenu i liczbie elektronów wymienionych na mol tlenu; I – natężenie prądu (A); t – czas trwania cykli (s), F – stała Farada (96500 C·mol⁻¹; V_{AN} – objętość cieczy w komorze anodowej (ml), $\Delta ChZT$ – zmiana stężenia ChZT (mg·L⁻¹)

6.6.2 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Analizę próbek GC-MS przeprowadzono za pomocą chromatografu gazowego HP6890 wyposażonego w detektor masowo-selektywny HP5973 i kolumnę kapilarną DB-1701 (30 m × 0,25 mm i.d., grubość warstwy 0,25 μm). Jako gaz nośny zastosowano hel (czystość 99,999 %). Temperaturę kolumny programowano od 40°C do 260°C z prędkością 10°C·min⁻¹ po początkowym 4-minutowym okresie izotermicznym i utrzymywano w temperaturze końcowej przez 20 minut. Wlot ustawiono na 250°C. Spektrometr masowy ustawiono na napięcie jonizujące 70 eV z zakresem mas m/z 29-450. Identyfikacja związków organicznych została przeprowadzona poprzez porównanie widm mas rozdzielonych składników przy użyciu procedur wyszukiwania w bibliotece elektronicznej NIST i następujących źródeł [177,178].

6.7 Analiza morfologiczna biofilmu

6.7.1 Mikroskopia fluorescencyjna

Analizę zdjęć mikroskopii fluorescencyjnej przeprowadzono w celu zbadania powierzchni biofilmu anody. Pod koniec eksperymentu anody zostały utrwalone za pomocą 4 % aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym 0,1M przez 30 minut, a następnie wypłukane w wodzie DI. Utrwalone anody zabarwiono $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), oranżem akrydyny i czerwienią nilową i inkubowano w ciemności przez 30 minut. Zabarwiony biofilm na materiale elektrody został zobrazowany przy użyciu mikroskopu Zeiss Axioscope 5/7 (półprzewodnikowe źródło światła Colibri 3 (typ RGB-UV); kamera mikroskopowa Axiocam 702 mono (Zeiss, Niemcy) przy powiększeniu 250x (obiektyw ApoChrom 25x) w zanurzeniu olejowym. Zdjęcia były wykonywane w sposób automatyczny i skokowy za pomocą zmotoryzowanego stolika, obsługiwanego oprogramowaniem Zen (Zeiss, Niemcy, wersja 3,0). Projekcje uzyskano poprzez dalsze przetwarzanie danych obrazu z mikroskopu fluorescencyjnego. Liczbę i rozmiar cząstek na obrazie obliczono ze stosów obrazów za pomocą dodatkowego oprogramowania do ImageJ o nazwie 3D Object Counter.

6.7.2 Obrazowanie skaningowym mikroskopem elektronowym

Powierzchnię biofilmu anody zbadano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (Jeol JSM-6610LVnx). Próbki anody zanurzono w 2,5 % roztworze aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym (pH 7,4) na 12 godzin w temperaturze 4°C, a następnie anody odwodniono w kąpieli gradientowej etanol-woda o stężeniach od 50 do 100 % co 10 %. Na koniec próbki płukano trzykrotnie w roztworze buforu fosforanowego przez 10 minut [179]. Po usunięciu pozostałości wody i odparowaniu alkoholu próbki były przechowywane w suszarce w temperaturze 40°C do czasu analizy. Wszystkie próbki zostały pokryte złotem przed analizą.

6.8 Analiza składu mikrobiologicznego

W trakcie badań przeprowadzono analizę składu mikroorganizmów w ramach wewnętrznej współpracy Laboratorium Mikrobiologicznych Układów Elektrochemicznych oraz współpracy z Uniwersytetem Tartu, Estonia.

6.8.1 Ekstrakcja DNA

Wszystkie próbki DNA zostały wyizolowane przy użyciu zestawu Bead-Beat Micro AX Gravity (A&A BIOTECHNOLOGY, Warszawa, Polska). Jakość i liczbę ekstraktów DNA oceniano spektrofotometrycznie przy użyciu NanoDrop™ 2000/2000c (ThermoFisher Scientific, USA).

6.8.2 Sekwencjonowanie genu 16S rRNA i analiza bioinformatyczna

Różnorodność drobnoustrojów została określona przy użyciu ukierunkowanego sekwencjonowania regionu V3-V4 w obrębie genu 16S rRNA. Do amplifikacji i późniejszego przygotowania biblioteki wykorzystano startery 16S rRNA, a dokładnie 341F i 785R [180]. Proces amplifikacji przeprowadzono przy użyciu Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, przestrzegając warunków reakcji opisanych przez producenta. Sekwencjonowanie parami wykonano przy użyciu zestawu Illumina v3 na urządzeniu MiSeq, uzyskując odczyty o długości 2×300 nukleotydów. Analizę bioinformatyczną przeprowadzono za pomocą platformy QIIME 2 [181] w połączeniu z pakietem DADA2 [182]. Wstępna analiza bioinformatyczna obejmowała kontrolę jakości i przetwarzanie sekwencji. Dynamiczne parametry kontrolne zostały wygenerowane w oparciu o model błędu specyficzny dla każdej próbki przy użyciu narzędzia FIGARO. Ponadto podjęto środki kontroli jakości w celu zapewnienia, że maksymalne oczekiwane poziomy błędów każdej próbki mieszczą się w dopuszczalnych granicach. Uzyskane sekwencje zostały poddane wstępnemu przetwarzaniu przy użyciu narzędzia Cutadapt. Klasyfikacja taksonomiczna reprezentatywnych sekwencji Amplicon Sequence Variants (ASVs) została przeprowadzona za pomocą referencyjnej bazy danych Silva 138 z dwuetapowym podejściem hybrydowym. Najpierw przeprowadzono dokładne dopasowanie odczytów do referencyjnej bazy danych przy użyciu narzędzia Vsearch [183]. Wszystkie odczyty, które nie zostały dopasowane w poprzednim kroku, zostały sklasyfikowane przy użyciu metody sklearn dostępnej w module q2-feature-classifier programu QIIME [184].

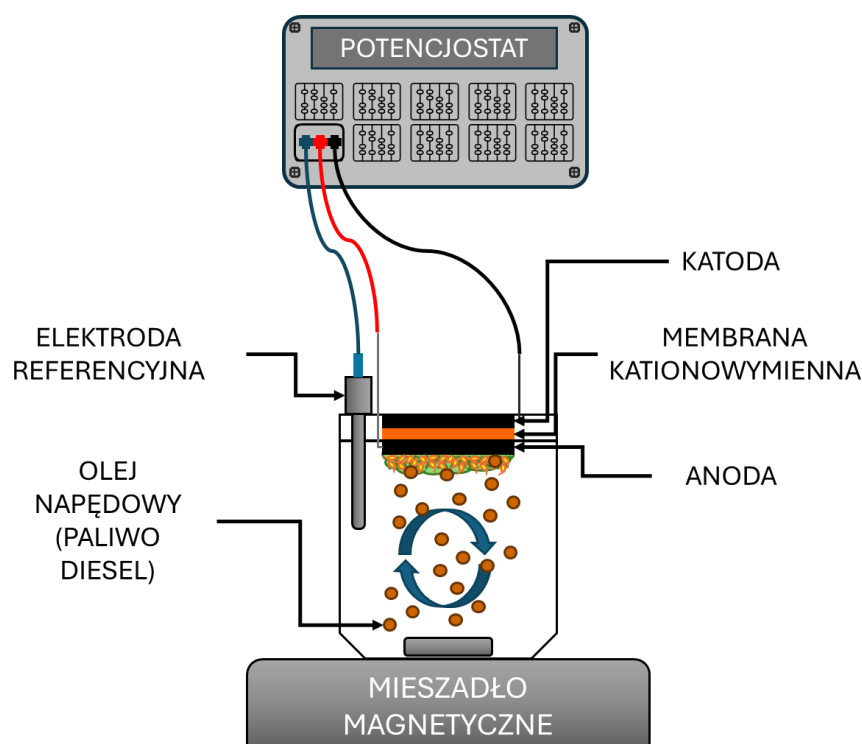
VII. Wyniki i dyskusja

7.1 Wpływ potencjału anodowego na zależność między bioróżnorodnością a mocą generowaną przez bakterie anodowe wzbogacone z gleby zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi

7.1.1 Opis przeprowadzonego doświadczenia

Trzelektrodowy system BES został zbudowany z polipropylenowego naczynia o pojemności 150 ml (rysunek 13). Anodę wykonano z welonu z włókna węglowego (PRF Composites Materials, Wielka Brytania) o powierzchni geometrycznej 9 cm². Katodę powietrzną wykonano z węgla aktywnego (CWZ-22) z siatką ze stali nierdzewnej jako kolektorem elektronów. Do połączenia elektrod z potencjostatem początkowo użyto drutu ze stali nierdzewnej 304 LSi, który po miesiącu ze względu na korozję został wymieniony na drut ze stali nierdzewnej 308 LSi. Jako separatora użyto dostępnej na rynku membrany kationowymiennej (CMI-7000. USA). Elektrodami referencyjnymi używanymi w systemie były RE-1B (elektroda Ag/AgCl, ALS Co., Japonia). Reaktor był wyposażony w mieszadło magnetyczne, które umożliwiało równomierne rozproszanie hydrofobowego oleju napędowego w roztworze soli mineralnych. Jako źródło mikroorganizmów wykorzystano glebę zebraną z okolic publicznego parkingu na obszarze miejskim Wrocławia (51,114069°N, 17,071237°E, Wrocław w Polsce). Zebrana gleba została przesiana w celu oddzielenia kamieni i korzeni. Do inokulacji przygotowano zawiesinę zawierającą 15 gram gleby w 150 ml MSM. Roztwór soli mineralnych, używany jako elektrolit, został przygotowany zgodnie z wcześniejszym opisem [185].

Jako źródło węgla użyto dostępnego na rynku oleju napędowego 0,1 % (v/v). Zastosowany olej napędowy zawierał około 75 % węglowodorów alifatycznych (C₁₀H₂₀-C₁₅H₂₈) i około 25 % węglowodorów aromatycznych (np. benzen, styren). Przez czas trwania eksperymentu wszystkie reaktory były zasilane olejem napędowym w trybie okresowym. Zasilanie nowym substratem odbywało się raz w tygodniu lub gdy natężenie prądu znacząco malało, wskazując koniec cyklu. Po pierwszej wymianie substratu cała gleba została usunięta z komory anodowej i zastąpiona czystym roztworem soli mineralnych z olejem napędowym o takim samym stężeniu.



Rysunek 13 Schemat konfiguracji eksperymentalnego układu bioelektrochemicznego.

Poza procesem wymiany roztworu na nowy oraz przeprowadzanymi pomiarami elektrochemicznymi, potencjostat MultiPalmSens 4 (PalmSens) posłużył do ustawienia każdej z anod BES na jeden z docelowych potencjałów: $-0,3$ V; $0,0$ V i $+0,3$ V względem referencyjnej elektrody Ag/AgCl. Natężenie prądu było monitorowane w czasie rzeczywistym za pomocą wielokanałowego potencjostatu z trzuminutowym interwałem próbkowania.

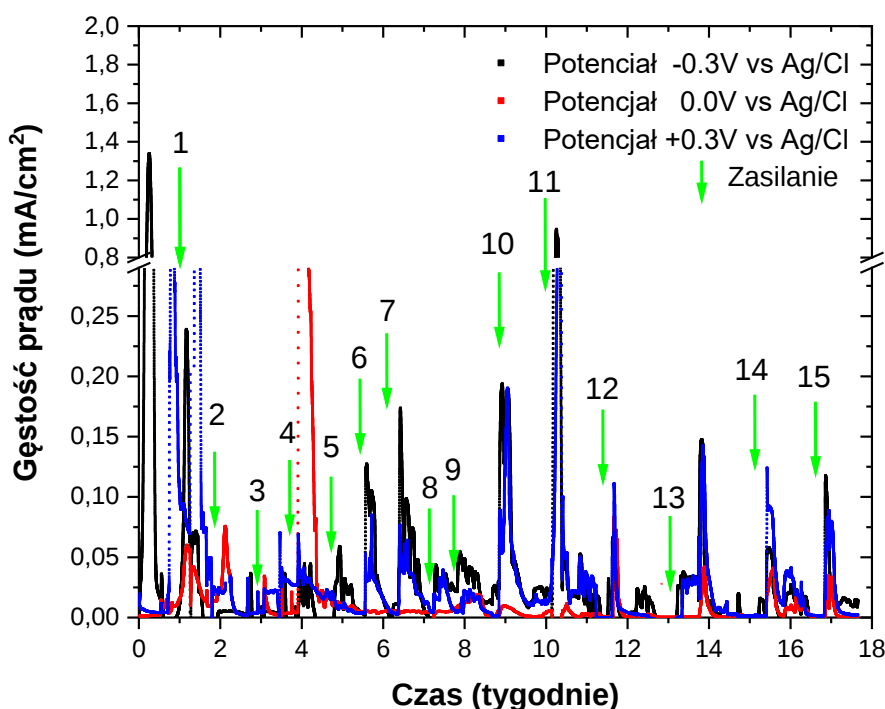
7.1.2 Analiza produkcji prądu elektrycznego w trakcie eksperymentu

Prąd generowany w trakcie eksperymentu oraz jego wartości natężenia przeliczone na powierzchnię elektrody zostały zaprezentowane na rysunku 14. Po inokulacji zaobserwowano znikome wartości generowanego prądu, a widoczne na wykresie sygnały wynikały z procesów korozyjnych drutu ze stali nierdzewnej 304 LSi.

Po pięciu tygodniach pracy (zasilanie nr 6) zaobserwowano tendencję BES do powtarzania sygnałów o podobnym czasie trwania, ale różnej intensywności. Identyczną charakterystykę wykazywały układy pracujące pod potencjałami $-0,3$ i $+0,3$ V. Najwyższą wartość gęstości prądu zaobserwowano dla BES $-0,3$ V (sygnał $0,94 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ w 10. tygodniu po zasilaniu 11). BES pracujący pod dodatnim potencjałem $+0,3$ V osiągnął przybliżone wartości w końcowej części eksperymentu, równe $0,62 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ w 10. tygodniu pracy. W przypadku układu elektrochemicznego pracującego przy potencjale $0,0$ V najwyższa wartość maksymalnego pojedynczego sygnału została zaobserwowana

w 11. tygodniu (zasilanie 12) i wyniosła $0,08 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$. Po odrzuceniu dwóch skrajnych wartości obliczono średnią wartość gęstości prądu dla wszystkich cykli. Dla BES $-0,3 \text{ V}$ ($0,116 \pm 0,058 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$) zaobserwowano wyższe wartości w porównaniu z BES $+0,3 \text{ V}$, w którym wynosiły one $0,093 \pm 0,046 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$. Wartości te wskazują, że dodatni potencjał przyczynia się do krótszego czasu rozruchu BES, podczas gdy ujemny potencjał prowadzi do poprawy długoterminowej wydajności [186].

Dane te pokazują, że wydajność procesu produkcji prądu elektrycznego przez biofilm anodowy jest uzależniona od przyłożonego potencjału. W pracy Y.H. Honga i in. wykazano, że ujemne potencjały przyspieszyły wzrost biofilmu i w konsekwencji skróciły czas adaptacji mikroorganizmów do procesu produkcji prądu. W eksperymencie tym zastosowano proste podłoża, takie jak octan sodu lub cukry [187]. Mechanizm ten był jednak nieznany dla tak złożonych substratów, jak produkty ropopochodne. U K. Sathish-Kumar i in. zauważono, że w długim okresie (kilku miesięcy) nagromadzenie martwych komórek prowadzi do zwiększenia wartości oporów wewnętrznych biofilmu, a w konsekwencji do spadku wartości natężenia generowanego prądu [188]. Zjawisko to może wynikać z agresywnego charakteru składników oleju napędowego w stosunku do martwych komórek oraz ich adsorpcji na powierzchni tych komórek. Niemniej jednak takie zjawisko nie zostało tutaj zaobserwowane, co zostało potwierdzone pomiarami EIS (rysunek 16).



Rysunek 14 Wyniki pomiarów chronoamperometrycznych. Strzałki z numerami wskazują zasilanie reaktorów nową porcją pożywki ze źródłem węgla.

7.1.3 Analiza pomiarów elektrochemicznych

Woltamperometria liniowa

Badania woltamperometrii liniowej wykazały, że najwyższą wartość gęstości mocy uzyskano w 14. tygodniu pracy BES. Wartość ta wynosiła $83,2 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ i została zaobserwowana dla biofilmu dojrzewającego pod potencjałem $-0,3 \text{ V}$ (rysunek 15). Wynik ten był wyższy niż wartości reprezentowane w literaturze naukowej, w których jako inokulat wykorzystano glebę, osad rzeczny, osad czynny i inne próbki środowiskowe. W tabeli 4 przedstawiono maksymalne natężenia prądu i gęstości mocy w tym eksperymencie w porównaniu do wyników opisanych w literaturze.

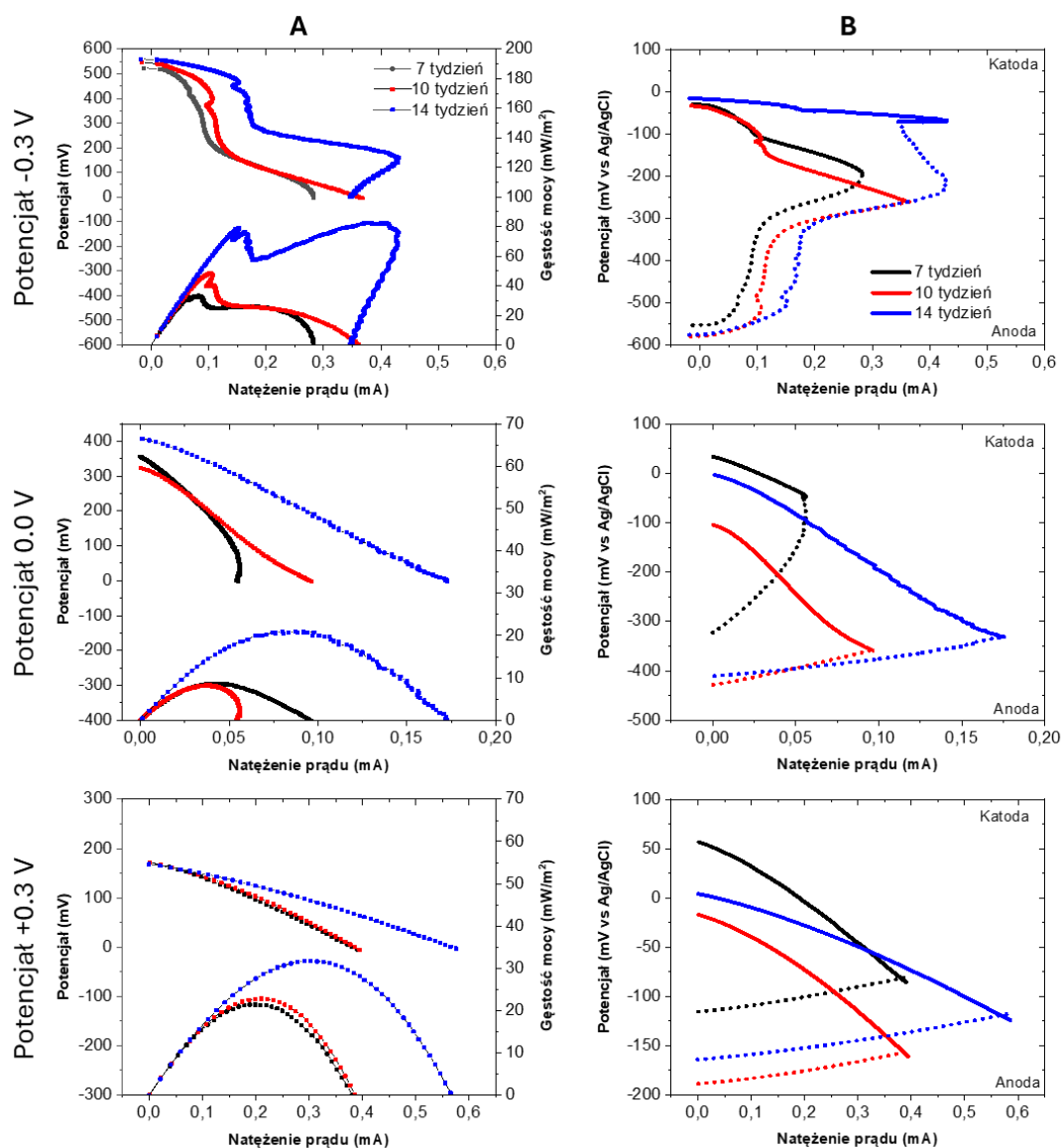
Tabela 4 Porównanie wyników wzbogacania elektroaktywnego biofilmu z różnych badań.

<i>Inokulat</i>	<i>Źródło węgla</i>	<i>Rodzaj BES</i>	<i>Użyty potencjał Względem Ag/AgCl</i>	<i>Max. natężenie absolutne [mA]</i>	<i>Max. gęstość prądu [mAcm^{-2}]</i>	<i>Max. gęstość mocy [mWm^{-2}]</i>	<i>Źródło</i>
Gleba z obszaru miejskiego Wrocławia	Olej napędowy / paliwo diesel	SCMFC	$-0,3 \text{ V}$	8,35	0,92	83,2	Ta praca
			$0,0 \text{ V}$	0,74	0,08	20,9	
			$+0,3 \text{ V}$	5,37	0,60	31,6	
Mieszanina próbek z rzeki, stawu i osadu czynnego	Glukoza, Octan sodu	HCMFC (Half Cell)	$-0,1 \text{ V}$	0,9	N.A.	$64,6 \pm 3,5$	[176]
Bakterie fermentacyjne w kompostowniku	Kompost (Eco-Terre) zakupiony w centrum ogrodniczym	N.A.	$+0,144$, $+0,344^a$, $+0,444$, $+0,544$ and $+0,744 \text{ V}$	0,29	0,015	N.A.	[189]
Osad czynny ze ścieków	Octan sodu	DCMEC	$-0,347^a$, $-0,287$, $-0,177$, I $+0,173 \text{ V}$	9,27	1,03	N.A.	[190]
Wzbogacony tlenowy osad z oczyszczalni ścieków Qige	Octan sodu, Sacharoza	DCMEC	$-0,45$, $-0,29^a$, 0,01, 0,31, and 0,61 V	4,02	$0,36 \pm 0,04$	N.A.	[186]
Inokulat zasolonej gleby sodowej (Meksyk)	Octan sodu	SCMFC	$-0,106 \text{ V}$	1,8	0,08	49,0	[188]
Gleba zanieczyszczona węglowodorami ropopochodnymi	Octan sodu	HCMFC (Half Cell)	$+0,344 \text{ V}$	0,45	0,045	220	[191]
Gleba z francuskiego atlantyckiego	Octan sodu	SCMFC	$-0,056 \text{ V}$	6,25	0,26	N.A.	[192]

portu przybrzeżnego							
Ścieki rafineryjne z zakładu petrochemiczne go	Związki BTX	SCMFC	+0,244 V	$4,5 \pm 0,1$	0,14	N.A.	[193]
Komunalny osad czynny i ścieki rafineryjne	Fenol	Bioelectric Well Cylinder	+0,244 V	$5,3 \pm 0,2$	0,16	N.A.	[194]

^a – dane w tej tabeli prezentowane są dla wybranego, podkreślonego potencjału w danym zakresie

Pozostałe układy bioelektrochemiczne charakteryzowały się niższymi wartościami gęstości mocy w trakcie pomiarów. Drugą najwyższą wartość gęstości mocy zaobserwowano dla BES +0,3 V ($31,6 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) oraz 0,0 V ($20,9 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$). Niska wartość gęstości mocy układu pracującego pod napięciem +0,3 V mogła wynikać z dodatnio spolaryzowanej anody, która była czynnikiem limitującym w trakcie procesu (rysunek 15). Krzywe polaryzacji wszystkich BES przedstawiono na rysunku 15.



Rysunek 15 Krzywe polaryzacji i krzywe mocy dla układów bioelektrochemicznych. **A** – krzywe polaryzacji poszczególnych elektrod w układach bioelektrochemicznych; **B** – dla tygodni 7, 10 i 14. Na wykresach B krzywa ciągła oznacza krzywą polaryzacji anody, krzywa kropkowana oznacza krzywą polaryzacji katody.

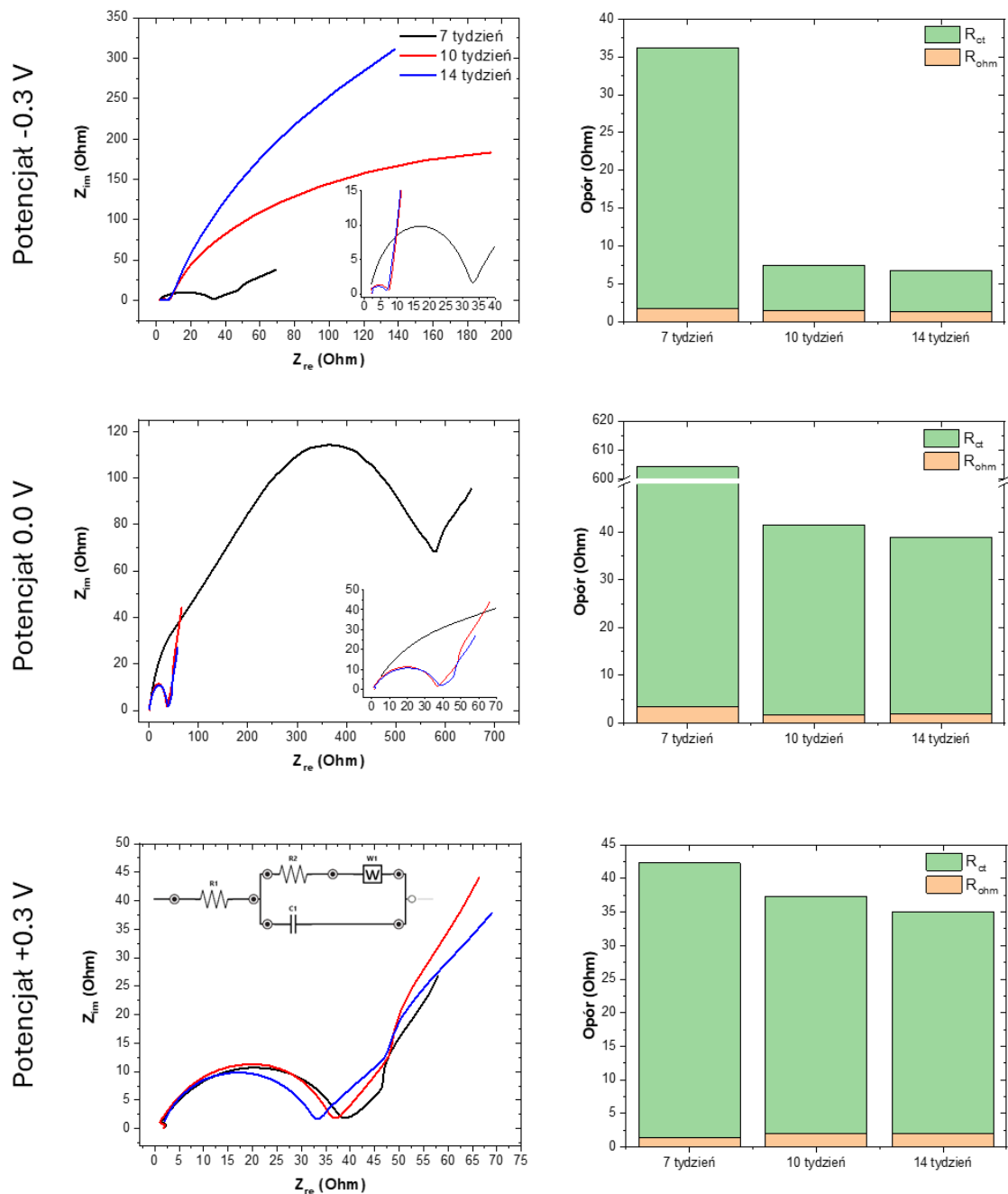
Zarówno dla potencjału 0,0 V, jak i +0,3 V przedstawione na wykresach kształty krzywych są łagodne. Wyniki te odpowiadają w pełni rozwiniętemu biofilmowi, który zaobserwowano już po 7 tygodniach działania układów. Natomiast dla potencjału -0,3 V zaobserwowano zjawisko przeregulowania (z ang. *overshoot phenomenon*), które występuje przy wysokich gęstościach prądu generowanego przez biofilm. Może ono również wpływać na zmianę rezystancji wewnętrznej układu bioelektrochemicznego [124]. Pojawienie się tego zjawiska wiązano u I. Ieropoulosa i in. z niewystarczającą zdolnością mikroorganizmów do produkcji elektronów w wyższym zakresie natężenia prądu, która była nieporównywalnie wyższa niż zdolność do ich przenoszenia [195]. Nagromadzenie związków ropopochodnych na powierzchni anody wraz z warstwą biofilmu mogło wpłynąć na wystąpienie zjawiska przeregulowania związanego ze

stratami omowymi, stratami stężeniowymi i transportu masy. Podobne wnioski dla toksycznych związków zaobserwowano w pracy J. Winfielda i in. [196]. W przypadku BES, który działał pod potencjale $-0,3$ V, dwukrotnie zaobserwowano przeregulowania, z których największe występowało w obszarze krzywej związanej ze stratami stężeniowymi i transportem masy. Wydajność katod ulegała znacznej poprawie wraz z upływem czasu. W artykule A. de Rosseta i in. wykazano, że akumulacja soli zwiększa wydajność produkcji prądu elektrycznego. Zjawisko to staje się jednak negatywne po przekroczeniu optymalnej wartości przewodności [197]. BES pracujący przy potencjale $0,0$ V charakteryzował się najniższą wydajnością i produkcją energii elektrycznej, co wskazuje, że wzbogacanie społeczności elektroaktywnej było nieskuteczne.

Ponadto dodatkowa analiza krzywych polaryzacji katody wykazała wysokie straty związane ze stężeniem i transportem masy we wszystkich badanych układach. Każda z zastosowanych katod była identyczna, co minimalizowało wpływ czynników zewnętrznych na występowanie różnic w procesach elektrochemicznych. W ogniwie pracującym pod potencjałem $-0,3$ V zaobserwowano gwałtowny spadek napięcia BES oraz zjawisko przeregulowania w obszarze strat stężeniowych i transportu masy. Dla ogniwa pracującego przy potencjale $0,0$ V zaobserwowano duży kąt nachylenia krzywej polaryzacji katody, na który wpływ mogła mieć obecność strat aktywacyjnych, omowych, stężeniowych i transportu masy. Krzywa ta uzyskiwała ujemne wartości pod koniec polaryzacji, co mogło dodatkowo wskazywać na ograniczający wpływ katody na proces produkcji prądu elektrycznego przez biofilm. Zastosowanie potencjału $+0,3$ V na BES skutkowało dodatnią polaryzacją układu w całym zakresie pomiaru LSV. Dla tego układu zaobserwowano również wysokie wartości prądu i wyliczonej gęstości mocy, które mogły wskazywać na korzystne warunki wzbogacenia biofilmu elektroaktywnego.

Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna

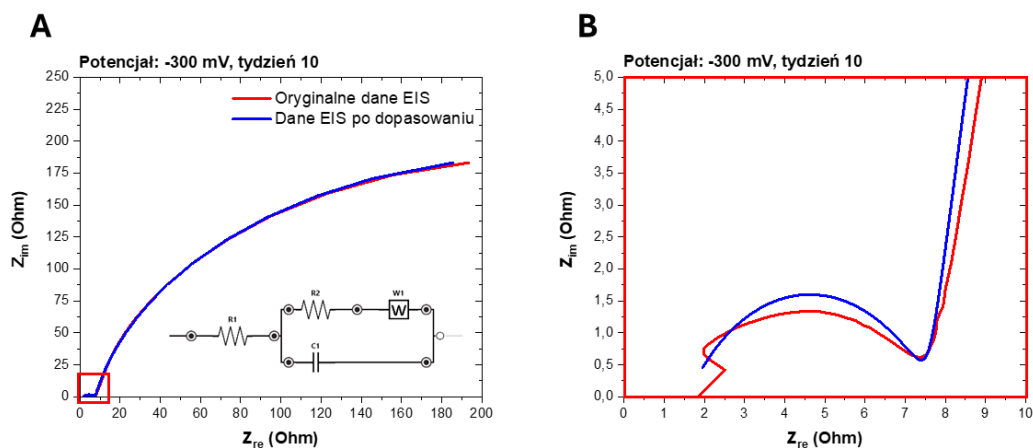
Wykresy Nyquista (rysunek 16) przedstawiają wyniki pomiarów przeprowadzonych w 7., 10. i 14. tygodniu eksperymentu. Dane zostały dopasowane zgodnie z zaproponowanymi przez N. Sekara i in. obwodami elektrycznymi [175], umożliwiając określenie rezystancji omowej (R_{ohm}) i rezystancji transportu ładunku elektronowego (R_{ct}). Uzyskane wykresy Nyquista składają się z jednego półkola i elementu dyfuzyjnego Warburga.



Rysunek 16 Wykresy Nyquista wraz z wykresami słupkowymi przedstawiające rozkład komponentów w trakcie badania EIS w 7., 10. i 14. tygodniu. Na wykresach użyto skrótów oznaczających: R_{ct} – rezystancja transferu ładunku, R_{ohm} – rezystancja omowa.

Analiza wykresów wykazała, że rezystancja omowa nie zmieniła się znacząco w trakcie eksperymentu. We wszystkich systemach wynosiła ona odpowiednio 2 Ω (-0,3 V, +0,3 V) oraz 4 Ω w przypadku BES przy potencjale 0,0 V. Rezystancja transferu ładunku była w dużym stopniu zależna od zastosowanej strategii wzbogacania. W przypadku BES działającego pod potencjałem -0,3 V zaobserwowano znaczny spadek R_{ct} z 34 do 6 Ohm. W pozostałych układach MFC również zaobserwowano spadek rezystancji związanej z transferem ładunku. Największy spadek R_{ct} zaobserwowano przy zastosowanym

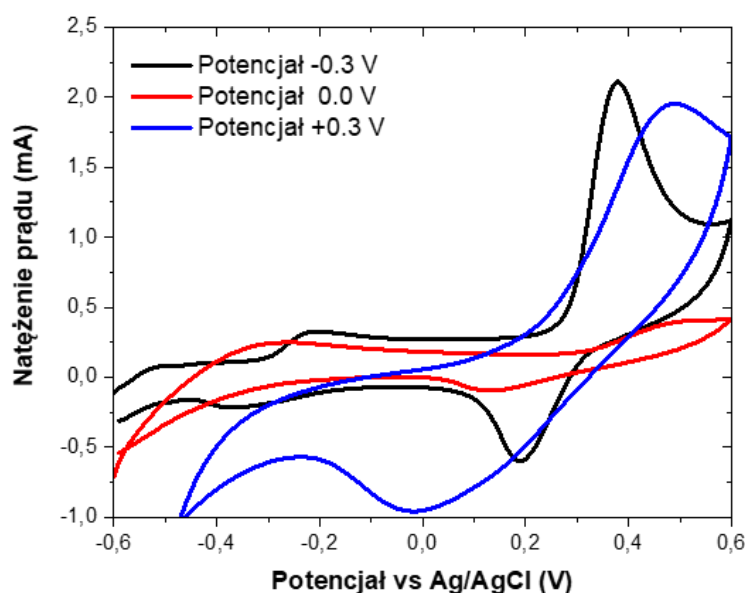
potencjał anody równym 0,0 V, gdzie wartość rezystancji zmniejszyła się z 600 Ω do 39 Ω . W publikacjach A. Kumara oraz G. Pasteranka i in. stwierdzono, że lepiej rozwinięty biofilm cechuje się niższymi wartościami rezystancji podczas pracy układu [198,199]. Z tego względu potencjał -0,3 V okazał się najskuteczniejszy w formowaniu biofilmu o wysokiej zdolności do przenoszenia elektronów.



Rysunek 17 Wykres Nyquista dla pomiaru EIS MFC z potencjałem -0,3 V (względem Ag/AgCl), po 10 tygodniach. Kolorem czerwonym oznaczono dane eksperymentalne, kolorem niebieskim oznaczono dane po dopasowaniu do obwodu zastępczego. **A** – pełen zakres wyników; **B** – przybliżenie zaznaczone na czerwono obszarze.

Woltamperometria Cykliczna

By zbadać, jakie układy redoks były zaangażowane w zewnątrzkomórkowy transport elektronów, przeprowadzono badania woltamperometrii cyklicznej (rysunek 18). We wszystkich wzbogaconych społecznościach zaobserwowano cztery sygnały utleniające: 0,196 V i +0,379 V (-0,3 V); +0,489 V (0,0 V); +0,469 V (+0,3 V) wraz z odpowiadającymi im sygnałami redukcji: -0,376 V i +0,189 V (-0,3 V); +0,119 V (0,0 V); -0,020 V (+0,3 V). Na podstawie uzyskanych wyników badań zaobserwowano, że rozwinięte biofilmy wykorzystują różne mechanizmy transportu elektronów. Otrzymane woltamogramy w tym eksperymencie przedstawiono na rysunku 18.

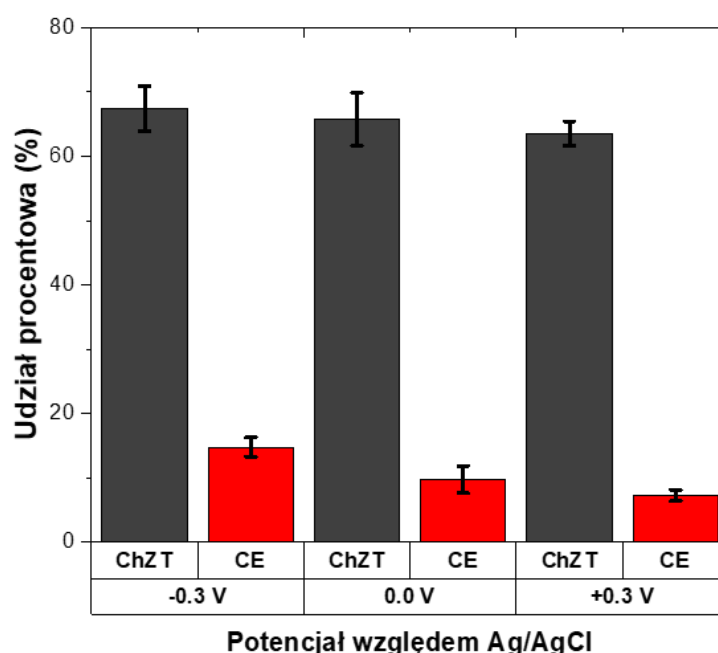


Rysunek 18 Woltamogramy cykliczne układów bioelektrochemicznych w 14. tygodniu eksperymentu.

Przy biofilmie wzbogacanym potencjałem -0,3 V mikroorganizmy korzystały z dwóch różnych układów redoks zaangażowanych w transfer elektronów. Pierwszy sygnał (potencjał formalny -0,286 V względem Ag/AgCl) mógł wskazywać na duży udział cytochromu typu c – OmcA, OmcB, OmcZ lub cytochromu wraz z pilami przewodzącymi OmcS produkowanymi przez *Geobacter sulfurreducens* [200,201]. Drugi sygnał przy potencjale 0,284 V względem Ag/AgCl mógł odpowiadać układowi redoks związanemu z azuryną wytwarzaną przez *Pseudomonas aeruginosa* [202] lub innym cytochromem błony typu c zewnętrznej – OmcF wytwarzanym przez *Geobacter spp* [201].

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że zastosowanie ujemnych potencjałów ma kluczowy wpływ na różnorodność mikrobiologiczną biofilmu elektroaktywnego zdolnego do degradacji oleju napędowego. Jest to sprzeczne z ustaleniami Zhua i in., gdzie opisano że zastosowany potencjał nie wpływa na strukturę społeczności [203]. Jak zauważono u R.C. Wagnera i in. zastosowanie dodatnich potencjałów pozwala mikroorganizmom generować więcej energii dla niektórych szlaków metabolicznych, w zależności od użytego substratu [204]. Jednak jak przedstawiono w niniejszym eksperymencie ujemny potencjał jest bardziej skuteczny we wspieraniu wzrostu biofilmu podczas degradacji związków ropopochodnych.

Wydajność Kulombowska

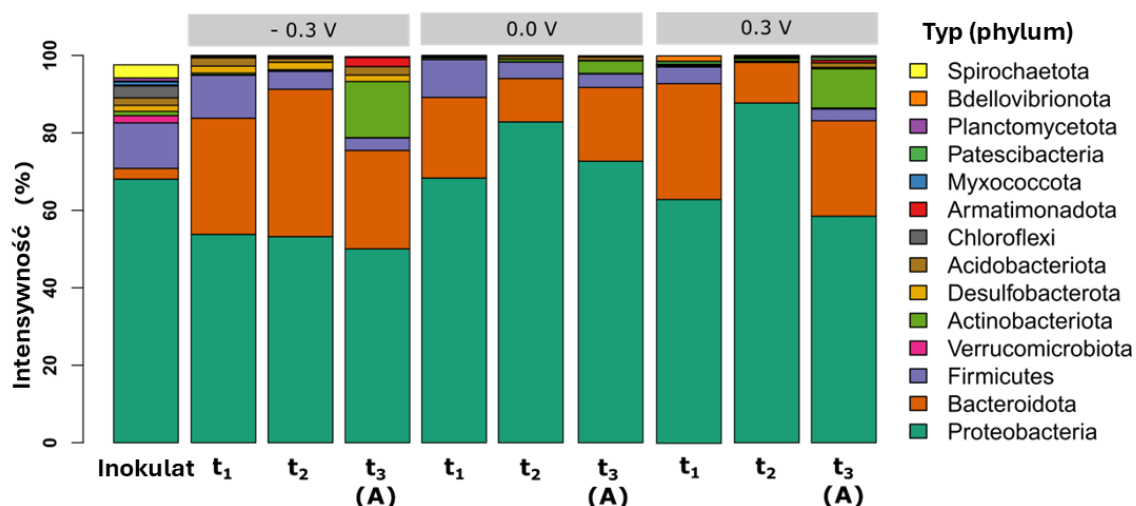


Rysunek 19 Procentowa zmiana wartości ChZT i obliczona wydajność kulombowska.

We wszystkich BES zmiana ChZT osiągała podobne wartości: $67,42 \pm 3,5$ % (-0,3 V), $65,74 \pm 4,1$ % (0,0 V), $63,54 \pm 1,9$ % (+0,3 V). Wydajność kulombowska (CE) dla potencjału -0,3 V osiągnęła najwyższą wartość równą $14,8 \pm 1,5$ %. Dla pozostałych dwóch układów CE nie przekroczyła 10 %. Wartości te wynosiły odpowiednio $9,8 \pm 4,1$ % (0,0 V) i $7,3 \pm 1,9$ % (+0,3 V) pod koniec okresu eksperymentalnego. Wyniki pomiarów przedstawiono na rysunku 19. Na tak niskie wartości CE w stosunku do otrzymanych wartości ChZT mogło wpływać wiele czynników, takich jak degradacja złożonych węglowodorów, produkcja dodatkowych związków zwiększających biodostępność lub pojawienie się innych szlaków metabolicznych niż te odpowiadające za produkcję prądu elektrycznego. Im bardziej wymagający substrat, tym więcej energii potrzebowały mikroorganizmy do jego degradacji. W eksperymencie wykorzystano olej napędowy, który jest mieszaniną trudnych związków w degradacji. Dodatkowo niskie wartości CE mogły wynikać z różnych szybkości rozwoju biofilmu elektroaktywnego. Co więcej, wartości ChZT i CE zostały zmierzone pod koniec eksperymentu, więc na wyniki mogły mieć wpływ zjawiska związane z zanieczyszczeniem membrany i elektrody oraz biofoulingiem [146]. Biorąc pod uwagę zastosowanie wyłącznie oleju napędowego jako substratu otrzymany wynik był wysoki w porównaniu do eksperymentów J.M. Morrisa oraz X. Li i in., w których olej napędowy był dodatkowo suplementowany biosurfaktantami [161,205] lub prostszymi związkami [165].

7.1.4 Analiza społeczności drobnoustrojów w roztworze anolitu i na elektrodzie pracującej

Próbki do analiz mikrobiologicznych zarówno z komory anodowej, jak i powierzchni anody pobierano w trzech punktach czasowych: po 10. (t_1), 15. (t_2) i 18. (t_3) tygodniach pracy. Społeczność drobnoustrojów utworzona na powierzchni anody została zbadana na koniec eksperymentu (t_3), co odpowiadało w pełni uformowanej społeczności biofilmu.

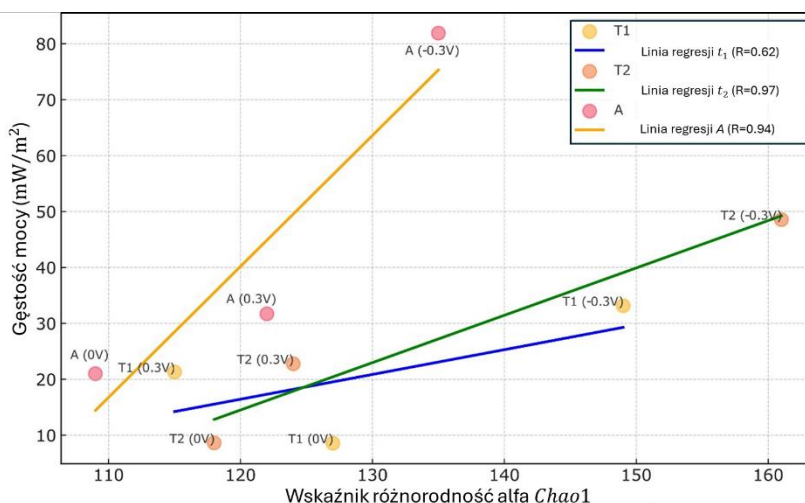


Rysunek 20 Analiza społeczności bakteryjnej. Profil względnej liczebności społeczności bakteryjnej na poziomie typu (phylum), porównanie próbek z BES i oryginalnego inokulatu.

Sekwencjonowanie ampliconu 16S rRNA w badaniu dało łącznie 1285100 odczytów, które zostały pogrupowane w 1238 wariantów sekwencji ampliconu. Uzyskane wyniki wykazały dużą rozbieżność w składzie społeczności bakteryjnej na poziomie gromady w porównaniu z oryginalną społecznością inokulum (rysunek 20). Podczas gdy *Proteobacteria* i *Firmicutes* były najliczniejszymi rodzajami w inokulacie, *Proteobacteria*, *Bacteroidota* i *Firmicutes* okazały się najbardziej rozpowszechnione w planktonicznych społecznościach układów bioelektrochemicznych. Dodatkowo *Actinobacteriota* stały się bardzo liczne w anodowych zbiorowiskach biofilmów. Jest to zgodne z wynikami poprzednich badań przeprowadzonych między innymi przez P. Clauwaert oraz S. Wang i in. [122,206]. Wykazano w nich, że zastosowane napięcie ma wpływ na tworzenie się społeczności bakterii w komorze anodowej. BES o najwyższej gęstości mocy (pracujące pod potencjałem -0,3 V) wykazywały niższy odsetek *Proteobacteria*, podczas gdy +0,3 V i 0,0 V sprzyjały ich wzrostowi. Z tego faktu może wynikać, że nadmierny wzrost *Proteobacteria* ma negatywny wpływ na wydajność elektrochemiczną MFC. Oryginalny inokulat gleby zawierał mikroorganizmy z rodziny *Spirochaetota*, *Chloroflexi* i *Verrucomicrobiota*, podczas gdy ich liczebność po wzbogaceniu w MFC była bardzo niska. Dodatkowo *Bacteroidota* i *Actinobacteriota* były liczniejsze w próbkach pochodzących z biofilmów anodowych, co wskazuje na ich znaczącą rolę w społeczności generującej prąd. W szczególności pod potencjałem -0,3 V, *Bacteroidota* osiągnęła najwyższy udział wynoszący 38 %. Im wyższa względna liczebność *Actinobacteriota* w biofilmie anodowym, tym BES generował prąd o wyższych wartościach natężenia i mocy. Najwyższą względną liczebność

Actinobacteriota, wynoszącą 15 %, zaobserwowano dla anodowej społeczności powierzchniowej BES -0,3 V, gdzie zaobserwowano najwyższe wartości gęstości mocy. Społeczność anodowa BES 0,0 V wykazała najniższe wartości gęstości mocy i najniższą wartość *Actinobacteriota* ze względną liczebnością równą 3 %. W związku z tym badanie to potwierdziło, że taksony bakteryjne tego rodzaju mogą odgrywać kluczową rolę w przenoszeniu elektronów podczas degradacji związków ropopochodnych w BES. W pracy D. Patel i in. wykazano, że te mikroorganizmy również charakteryzowały się wysoką liczebnością w zbiorowiskach anodowych, prowadząc do najwyższej wydajności. We wspomnianym eksperymencie wykorzystano ścieki glukozy i barwnika tekstylnego jako źródło węgla [207].

Wskaźnik różnorodności alfa Chao1 (z ang. *chao1 alpha diversity index*) obliczony na podstawie otrzymanych danych sekwencji genów (ASV z ang. *amplicon sequence variant*) pokazuje, że próbki poddane działaniu -0,3 V miały najwyższy stopień różnorodności, podczas gdy 0,0 V wykazywało najniższe wartości wskaźnika. Zgodnie z wynikami analizy statystycznej (ANOVA z ang. *Analysis of Variance*) różnice w wartościach Chao1 były znaczące ($P < 0,05$). Wartości wskaźnika dla potencjału -0,3 V były wyższe niż te dla 0,0 V i +0,3 V. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono pozytywny związek wskaźnika różnorodności alfa społeczności bakteryjnej na wydajność BES. Zostało to potwierdzone przez analizę związku między mocą a wartościami wskaźnika różnorodności dla społeczności t_1 , t_2 i anodowych (t_3). W celu określenia siły i kierunku liniowej zależności między zmiennymi wyznaczony został współczynnik korelacji Pearsona. Wartość współczynnika korelacji Pearsona między złożonością społeczności bakteryjnej a wydajnością produkcji prądu o wysokiej wartości mocy osiągnęła 0,97 dla t_2 i 0,94 dla społeczności anodowej (rysunek 21).



Rysunek 21 Zależność wskaźnika różnorodności alfa Chao1 od zastosowanego potencjału i gęstości mocy dla społeczności planktonicznych w dwóch punktach czasowych: t_1 i t_2 oraz społeczności na powierzchni anodowej A (t_3).

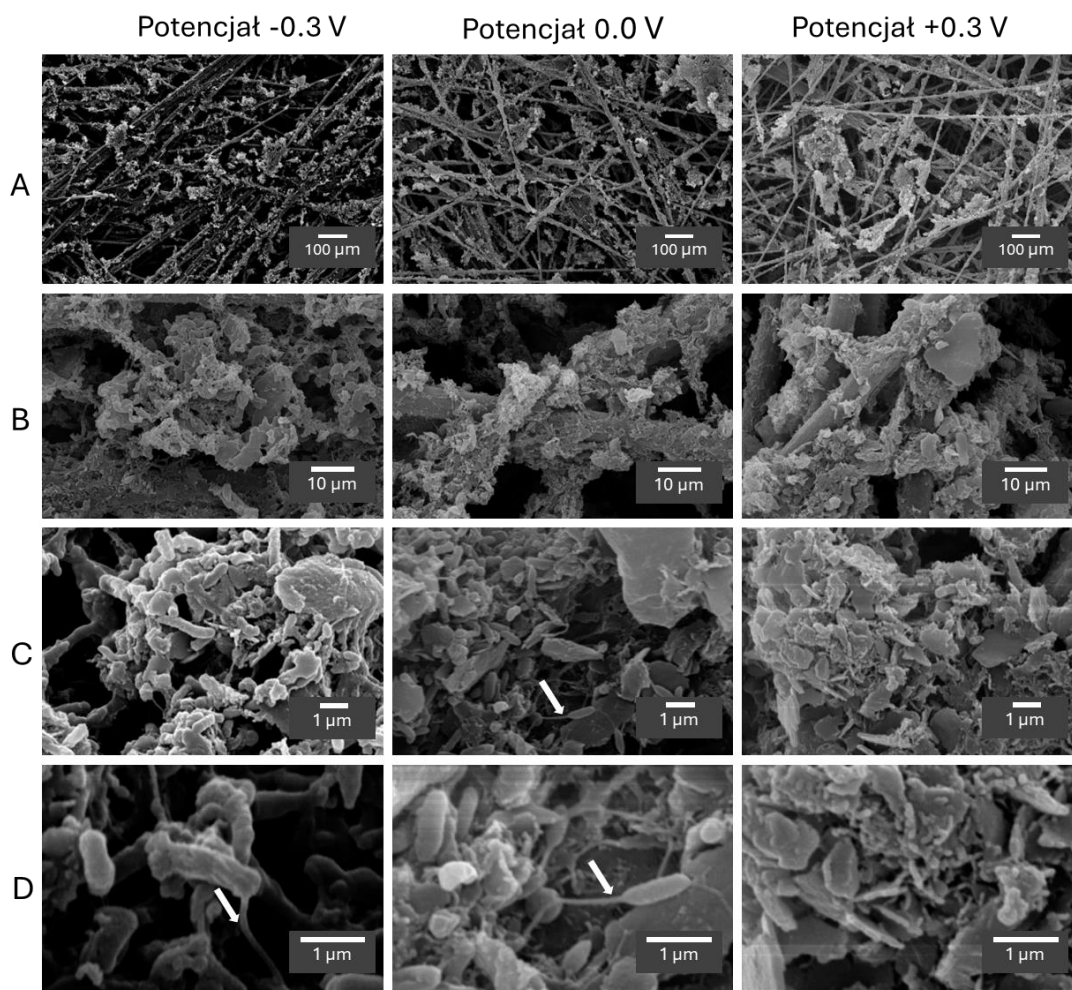
W przypadku systemów bioelektrochemicznych wykorzystujących olej napędowy jako substrat, który jest złożoną mieszaniną węglowodorów, skuteczna biodegradacja wymaga zróżnicowanego konsorcjum mikrobiologicznego o różnych zdolnościach

metabolicznych. Dane otrzymane w eksperymencie są sprzeczne z ogólną zasadą, że ekspozycja na toksyczne substraty prowadzi do specjalizacji społeczności mikrobiologicznych o niskiej bioróżnorodności. Wskazuje to, że mikrobiomy o zdolnościach elektroaktywnych są znacznie bardziej złożone i wymagają większej ilości różnorodnych szlaków metabolicznych w porównaniu do społeczności w konwencjonalnych procesach biodegradacji. Społeczności badanych w eksperymencie mikroorganizmów były bardziej zróżnicowane niż ich oryginalne inokulaty. Podobne wnioski zostały opisane w pracy M.T. Bidja i in. [208].

7.1.5 Analiza morfologiczna struktury wytworzonego w eksperymencie biofilmu

Obrazy SEM (rysunek 22) przedstawiają morfologię poszczególnych biofilmów anodowych. Anody zostały zebrane na koniec eksperymentu. Powierzchnia anody +0,3 V była głównie pokryta biofilmem, a w jej strukturze wykryto wysoki poziom wytrąconych soli i tlenków krzemu, co zostało potwierdzone przez mapowanie EDS. Włókna węglowe elektrod były równomiernie pokryte biofilmem dla BES -0,3 V i 0,0 V. Dla potencjału 0,0 V zaobserwowano wytrącone kryształy soli na powierzchni anody. W BES pracującym pod potencjałem -0,3 V biofilm rozwijał się dokładniej i intensywniej, bez jednoczesnej akumulacji dużej ilości jonów metali i ich soli. Biofilm ten posiadał również największy udział węgla w porównaniu do innych pierwiastków. Ponadto na zdjęciach w dużym powiększeniu (dla anod -0,3 V i 0,0 V) zaobserwowano pojedyncze pile przewodzące wytwarzane przez elektroaktywne mikroorganizmy. Niektóre mikroorganizmy mogą wykorzystywać pile w procesie transportu elektronów [209], a ich obecność może wskazywać na wykorzystanie bezpośrednich mechanizmów pozakomórkowego transportu elektronów przez bakterie tworzące biofilm.

Dodatkowe pomiary EDS wykazały, że biofilm anodowy -0,3 V miał najwyższy stosunek węgla w porównaniu do innych pierwiastków oraz pozostałych anod 0,0 i +0,3 V. Tabela 5 przedstawia względny udział pierwiastków w biofilmie. Najmniejszą względną ilość krzemu oraz największą ilość pierwiastkowego węgla zaobserwowano dla anody pracującej pod potencjałem -0,3 V. Jak wykazano u M. Simeona i in. tlenki metali i krzemu lub trudno degradowane związki ropopochodne mają negatywny wpływ na kontakt między powierzchnią elektrody a bakteriami, a także mogą zmieniać opór właściwy elektrody [210]. Zgodnie z powyższym zastosowany potencjał - 0,3 V stworzył najkorzystniejsze warunki dla rozwoju struktury biofilmu, co zostało potwierdzone danymi otrzymanymi w trakcie pomiarów elektrochemicznych oraz analizą bioróżnorodności.



Rysunek 22 Obrazy otrzymane skaningową mikroskopią elektronową. W kolumnach przedstawiono obrazy dla trzech bioanod. Wiersze A–D przedstawiają różne powiększenia dla danych próbek. Białe strzałki wskazują wykryte przewodzące nanorurki wyprodukowane przez mikroorganizmy.

Tabela 5 Analiza pierwiastkowa powierzchni bioanod wykonana metodą spektroskopii dyspersji energii (EDS).

Pierwiastek	-0,3 V	0,0 V	+0,3 V
	Procentowy udział atomów [%]		
Węgiel	72,91	59,02	35,23
Krzem	10,31	2,18	26,27
Żelaz	1,21	3,43	2,44
Miedź	6,98	1,78	3,01
Tlen	7,15	29,31	20,21
Glin	1,17	-	11,01
Potas	0,26	1,66	1,84
Nikiel	-	1,54	-
Wapń	-	1,09	-

7.1.6 Podsumowanie i wnioski

W niniejszym eksperymencie przedstawiono wpływ zastosowanych potencjałów anodowych na wzbogacenie elektroaktywnych społeczności bakterii zdolnych do degradacji związków ropopochodnych w oleju napędowym, a także dynamiczne zmiany ich właściwości. Anoda działająca pod potencjałem $-0,3\text{ V}$ charakteryzowała się najwyższą produkcją prądu elektrycznego o wysokiej wartości gęstości prądu $0,94\text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ i gęstości mocy $83,2\text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$. Ponadto, tylko biofilm $-0,3\text{ V}$ ujawnił dwa dominujące układy redoks zaangażowane w transfer elektronów do anody i najniższe wartości rezystancji. Eksperyment ten po raz pierwszy wykazał wpływ zastosowanego potencjału na układy bioelektrochemiczne, w których jako źródło węgla wykorzystano związki ropopochodne. Wykazano również, że te odporne związki mogą być przetwarzane bez dodatku substratu pomocniczego lub biosurfaktantu. Ujawniono silny wpływ potencjału anodowego na różnorodność społeczności bakterii, wskazując, że społeczności o największej różnorodności były najbardziej skuteczne w bioelektrochemicznej degradacji i konwersji związków ropy naftowej na prąd elektryczny. Było to spowodowane głównie liczną obecnością taksonów produkujących biosurfaktanty w społecznościach bakterii. Dodatkowo BES pracujący pod potencjałem $-0,3\text{ V}$ osiągnął najwyższy w eksperymencie udział *Bacteroidota* w społeczności biofilmu wynoszący 38 % oraz najniższy odsetek *Proteobacteria* w porównaniu do pozostałych układów. Zaobserwowano, że im wyższa względna liczebność *Actinobacteriota* w biofilmie anodowym, tym BES generuje prąd o wyższych wartościach natężenia i mocy.

Podsumowując, zmiany wartości ChZT wraz z CE mogą być wskaźnikami wydajności społeczności mikrobiologicznej w układach bioelektrochemicznych. Monitorowanie zmian wartości ChZT w czasie, może dać informację o tym, jak społeczność mikrobiologiczna radzi sobie z rozkładem substancji organicznych. Dodatkowo wysoka sprawność CE oznaczać może, że większa część energii z substratów została wykorzystywana przez mikroorganizmy do produkcji energii. W lepiej działającym ogniwie $-0,3\text{ V}$ większa część substratu została przekształcona w energię elektryczną. Proces ten skutkował wyższymi wartościami generowanego prądu. W innych układach BES, w których społeczności nie zostały odpowiednio wzbogacone, dominować mogły alternatywne szlaki metaboliczne, które nie koncentrowały się na wytwarzaniu prądu. Oznacza to, że zastosowanie odpowiedniej strategii wzbogacania ma kluczowe znaczenie dla uniknięcia długoterminowych, nieodwracalnych problemów z działaniem technologii bioelektrochemicznej remediacji. Otrzymane wyniki mogą doprowadzić do lepszego zrozumienia i działania systemów bioelektrochemicznych do biodegradacji związków ropopochodnych.

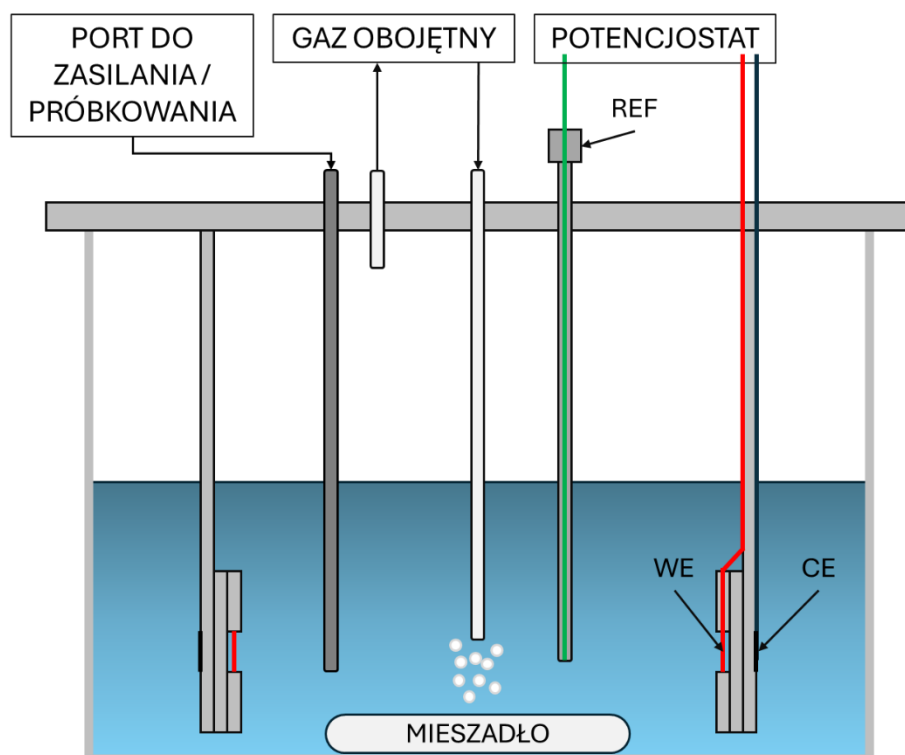
7.2 Zwiększenie wydajności bioelektrochemicznej degradacji ropy naftowej: wykorzystanie materiałów anodowych i zastosowanie enzymu lakazy

7.2.1 Opis przeprowadzonego doświadczenia

Układ bioelektrochemiczny w postaci Bateryjnego Szklanego Reaktora (BGR z ang. *battery glass reactor*) (rysunek 23) został zastosowany w celu zbadania wpływu przyłożonego potencjału na dojrzewanie oraz strukturę społeczności bakteryjnej elektroaktywnego biofilmu, zdolnego do generowania energii elektrycznej podczas degradacji oleju napędowego. Dokładny opis układu znaleźć można w pracy J. Erbeny i in. [211]. Reaktor składał się ze szklanego naczynia o pojemności 1 L, w którym zanurzono trzy rodzaje półogniw anodowych wraz z odpowiadającymi im przeciwelektrodami platynowymi. Wszystkie pozostałe elementy reaktora zostały wykonane ze szkła lub polipropylenu w celu zmniejszenia stopnia reakcji między chemikaliami a elementami reaktora. Układ został wyposażony w porty do pobierania próbek, wymiany pożywki mikrobiologicznej oraz gazu obojętnego. Standardowa elektroda kalomelowa (SCE z ang. *saturated calomel electrode*), o potencjale +0,244 V względem standardowej elektrody wodorowej (SHE z ang. *standard hydrogen electrode*), (Sensortechnik Meinsberg, Niemcy) została użyta jako elektroda odniesienia, a płytki platynowe (Goodfellow, Niemcy) o powierzchni podobnej do znormalizowanej powierzchni anody zostały użyte jako przeciwelektrody. Przed inokulacją pożywka i złożony BGR zostały poddane procesowi sterylizacji. Wszystkie późniejsze pomiary przeprowadzono w temperaturze 30°C.

Welon z włókna węglowego (CF) (PRF Composites Materials, UK), gąbka grafitowa (GS) (SGL Carbon, Niemcy) i welna ze stali nierdzewnej (SSW) (RAKSO, Oscar Veil GmbH, Niemcy) zostały użyte jako materiały anodowe. Aby usunąć zanieczyszczenia, w tym pozostałości smarów i tłuszczów z powierzchni anod, materiały anodowe poddano trzem kąpielom ultradźwiękowym: najpierw w acetonie, następnie w alkoholu izopropylowym, a na końcu w wodzie dejonizowanej. Każda kąpiel trwała 15 minut. Po kąpeli na elektrody nałożono polipropylenowe ramy, normalizując powierzchnię każdej z nich do poziomu 2,25 cm². W tym eksperymencie użyto duplikatów dla każdej próbki materiału.

Podłoże z soli mineralnych (MSM), używane jako elektrolit, zostało przygotowane zgodnie z wcześniejszym opisem [112]. W zależności od etapu eksperymentu źródłem węgla były: 10mM octan sodu z 0,05 % (v/v) z ropą naftową (etap A), ropa naftowa (0,05 % v/v) (etap B) lub ropa naftowa wstępnie trawiona enzymem lakazy 0,05 % v/v (etap C). Ropa naftowa użyta w eksperymencie została pozyskana dla Politechniki Wrocławskiej podczas wiercenia w Muzeum Przemysłu Naftowego i Gazowniczego im. Ignacego Łukasiewicza w Bóbrce. Wszystkie substancje chemiczne użyte do przygotowania pożywek były czystości 99 % (Carl Roth, Niemcy). Elektrolit poddawany był ciągłemu przedmuchiwaniu gazem obojętnym (w składzie: 20 % CO₂ i 80 % N₂). W eksperymencie, w etapie C, wykorzystano lakazę *Trametes versicolor* w postaci stałej ($\geq 1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) zakupionej od Carl Roth Supply.



Rysunek 23 Schemat konfiguracji układu baterijnego szklanego reaktora (BGR). Użyte skróty w rysunku: REF – elektroda referencyjna; WE – elektroda pracująca (anoda); CE – przeciwelektroda (katoda).

Zasilanie w fazach A i B odbywało się poprzez zdyspergowanie źródła węgla (octanu sodu i ropy naftowej lub samej ropy naftowej) w roztworze anolitu za pomocą ultradźwięków, a następnie zawrócenie roztworu do reaktora. Zasilanie w etapie C ponownie polegało na rozproszeniu źródła węgla (ropy naftowej) za pomocą ultradźwięków, a następnie dodaniu enzymu lakazy w postaci 10 mg związku. Po wymieszaniu roztwór zwracano do reaktora.

Do inokulacji wykorzystano przystosowane do degradacji związków ropopochodnych i produkcji prądu elektrycznego konsorcjum gleby zebranej z okolic publicznego parkingu w obszarze miejskim (Wrocław, Polska) wraz ze szczepem *Geobacter sulfurreducens* PCA (DSM12127). Konsorcjum to zastosowano wcześniej w mikrobiologicznym ogniwie paliwowym, pracującym pod obciążeniem 1 kOhm z ropą naftową jako jedynym źródłem węgla przez 6 miesięcy. Bakterie *Geobacter sulfurreducens* hodowano w warunkach beztlenowych, a komórki drobnoustrojów przygotowano zgodnie z wcześniejszym literaturowym opisem [212].

7.2.1 Analiza produkcji prądu elektrycznego w trakcie eksperymentu

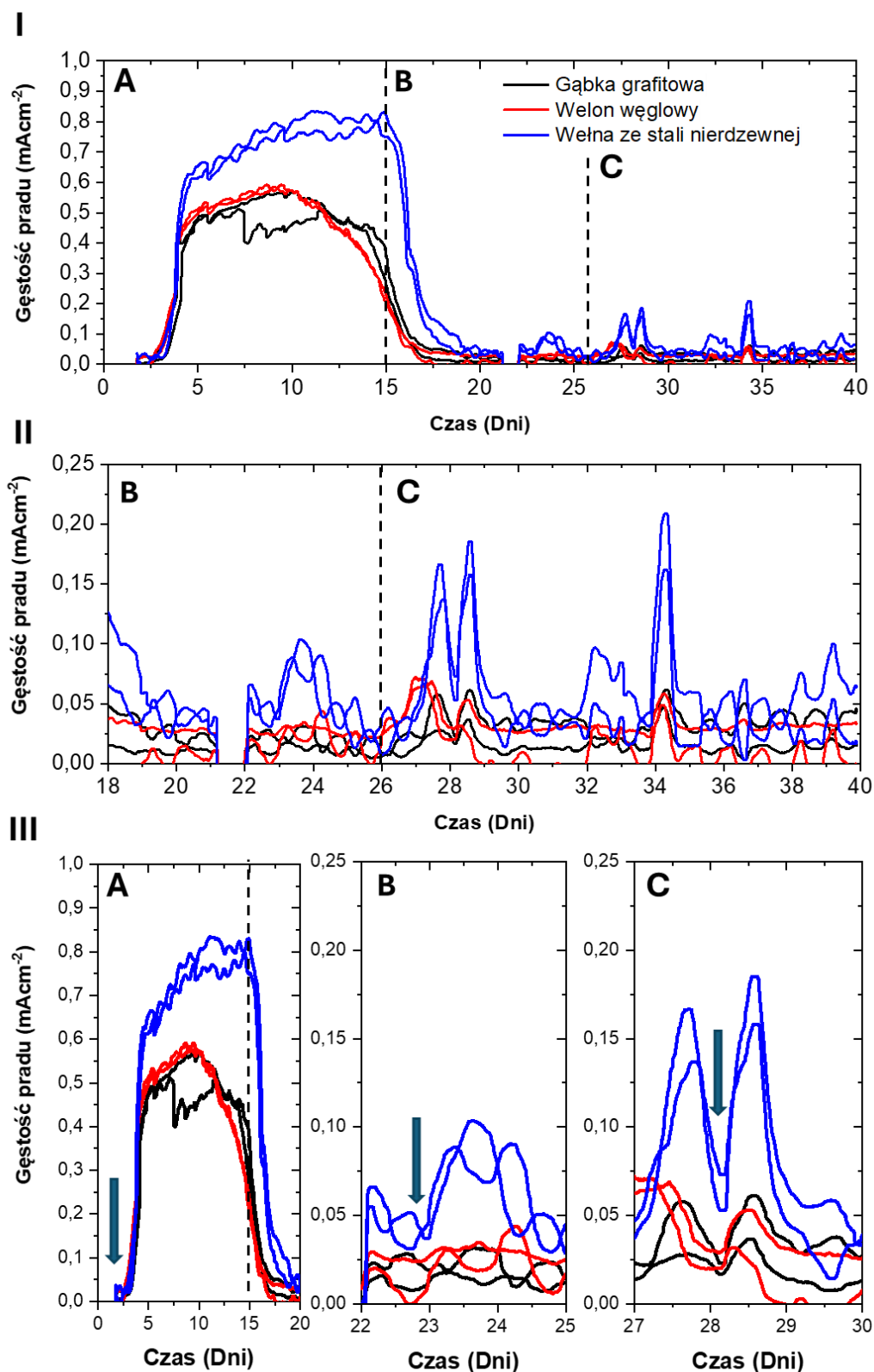
Aby zwiększyć adhezję bakterii i przyspieszyć proces wzrostu biofilmu na powierzchni anody, przez pierwsze 48 godzin reaktor pracował w trybie napięcia obwodu otwartego. Następnie dla anod ustawiono potencjał o wartości -0,345 V względem SCE

(odpowiednik $-0,3$ V względem Ag/AgCl), co było (jak wykazano w rozdziale 7.1 niniejszej pracy) efektywnym potencjałem do wzbogacania elektroaktywnych bakterii degradujących związki ropopochodne.

W niniejszym eksperymencie trzy różne materiały – gąbka grafitowa (GS), welon z włókna węglowego (CF) i wena ze stali nierdzewnej (SSW) – zostały ocenione pod kątem ich zastosowania w systemach bioelektrochemicznych zaprojektowanych do degradacji związków ropopochodnych, występujących w ropie naftowej. Materiały te zostały wybrane ze względu na powszechną dostępność i niski koszt. W celu poprawy wydajności elektrycznej społeczności glebowej, której wygenerowany prąd miał gęstość równą $0,116 \pm 0,058 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ przy $-0,3$ V względem Ag/AgCl w eksperymencie opisanym w rozdziale 7.1 tej pracy, inokulat został wzbogacony o szczep *Geobacter sulfurreducens*. Wyniki uzyskane z tego eksperymentu podsumowano w tabeli 6 i porównano z danymi literaturowymi.

Po okresie inokulacji w trybie otwartego obwodu układ BES został zasilony octanem sodu i ropą naftową (rysunek 24). Plateau produkowanego prądu o gęstości $0,516 \pm 0,028 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla GS, $0,553 \pm 0,015 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla CF oraz najwyższą wartość równą $0,778 \pm 0,055 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla SSW osiągnięto po pięciu dniach eksperymentalnych. Wartości te były wyższe niż te uzyskane w eksperymencie I. Vázquez i in., gdzie wykorzystano ścieki browarnicze jako źródło węgla, w którym maksymalna gęstość prądu wynosiła $0,450 \pm 0,07 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ [213]. Zastosowanie octanu sodu jako kosubstratu skutkowało długością trwania pojedynczego cyklu wynoszącym 9,5 dnia.

Po ograniczeniu substratu wyłącznie do ropy naftowej (rysunek 24I i 24II) zaobserwowano spadek produkcji prądu elektrycznego. Po wymianie źródła węgla zauważalne było również skrócenie czasu sygnałów, które trwały 1-1,5 dnia. Średnie wartości gęstości prądu uzyskanego podczas okresu zasilania wyłącznie ropą naftową wynosiły $0,007 \pm 0,004 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla GS, $0,008 \pm 0,006 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ oraz dla CF i $0,038 \pm 0,031 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla SSW. W kolejnym etapie zastosowano enzym lakazy jako związek wstępnie degradujący węglowodory ropopochodne. Spowodowało to poprawę produkcji prądu elektrycznego. W etapie C średnie wartości gęstości prądu uzyskanego były wyższe niż te w etapie poprzednim. Wartości te wynosiły odpowiednio: $0,021 \pm 0,012 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla GS, $0,020 \pm 0,017 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla CF i $0,107 \pm 0,052 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla SSW, co odzwierciedla odpowiednio 1,7; 2,5 i 2,8-krotną poprawę w porównaniu z etapem drugim (etap B) bez enzymu lakazy. Zgodnie z badaniami T. Diefenbacha i in. zastosowanie enzymu lakazy jako etapu wstępnej degradacji związków ropopochodnych prowadzi do fragmentacji długich alifatycznych łańcuchów węglowodorowych na krótsze [214]. Sam enzym lakazy może zwiększyć degradację takich związków jak: fenole, ligniny, barwniki, pestycydy i inne toksyczne związki, które mogą mieć wpływ na wartość ChZT. Parametr ten jednak nie zmienia się po samodzielnym zastosowaniu lakazy bez dodatku innego źródła węgla [215,216].



Rysunek 24 Wartości gęstości prądu uzyskanego dla trzech różnych materiałów anodowych. Etapy zasilania oznaczono pogrubioną czcionką: **A** – zasilanie octanem sodu i ropą naftową; **B** – zasilanie tylko ropą naftową; **C** – zasilanie ropą naftową wzbogaconą enzymem lakazy. W rzędzie I zaprezentowano dane dla całego okresu eksperymentu. W rzędzie II zaprezentowano przybliżenie na dane uzyskane od 18. do 40. dnia. W rzędzie III przedstawiono sygnały po zasileniu reaktora nową porcją substratu. Strzałkami oznaczono moment zasilenia w substrat.

Podczas całego okresu eksperymentalnego materiały na bazie węgla (GS i CF) wykazywały pomijalną różnicę w generowanym prądzie. Natomiast prąd otrzymany dla węłny ze stali nierdzewnej był najwyższy we wszystkich etapach eksperymentu. Dodatkowo długość sygnału po wymianie źródła węgla różniła się w zależności od użytego materiału anody. Dłuższymi sygnałami, a więc korzystnymi warunkami do degradacji związków ropopochodnych, charakteryzowała się anoda ze stali nierdzewnej (rysunek 24III). W etapie A zaobserwowano dla SSW sygnał o długości 16,36 dni (392,62 godzin), co było czasem dłuższym o 14,98 % w porównaniu do sygnałów GS oraz 16,93 % CF. W etapie B zaobserwowano dla SSW sygnał, który trwał 1,31 dnia (31,21 godzin), co było ponownie czasem dłuższym o 23,08 % od sygnału GS oraz 19,23 % od sygnału CF. Dodatkowo w etapie C, sygnał dla anody SSW po zasileniu utrzymywał się przez 1,52 dnia (36,48 godzin), co było czasem dłuższym od sygnału GS o 38,82 % oraz CF o 17,11 %. Wyniki te wskazują, że anody z węłny ze stali nierdzewnej charakteryzowały się lepszymi warunkami do długookresowej produkcji energii. To zjawisko mogło być związane bezpośrednio z budową anody, która charakteryzowała się znacznie większą średnicą włókien oraz odległościami między nimi w porównaniu do anod z materiałów węglowych. Taka budowa umożliwić mogła rozwój biofilmu oraz akumulację związków organicznych. Dlatego też średni czas trwania sygnału dla SSW był dłuższy niż dla materiałów węglowych.

Akumulowane związki organiczne mogą służyć jako dodatkowe źródło węgla i energii dla mikroorganizmów, stymulując ich wzrost i aktywność. Jeśli związki te są biodegradowalne, mogą przyczynić się do zwiększenia produkcji prądu [217]. Jednak zbyt duże stężenie zakumulowanych związków, może mieć negatywny wpływ na rozwój biofilmu. Akumulacja nierozpuszczalnych lub trudno degradowanych związków organicznych na powierzchni biofilmu może prowadzić do tworzenia się warstwy, która wpływa negatywnie na transport masy [218]. Ograniczona dyfuzja substratów może również spowolnić reakcje biochemiczne zachodzące w ogniwie, obniżając tym samym jego wydajność oraz zwiększając opory elektrody [219]. Dodatkowo związki organiczne, szczególnie związki ropopochodne, mogą działać toksycznie lub inhibować rozwój organizmów. Ich akumulacja może zmniejszać aktywność biofilmu, co prowadzi do spadku produkcji prądu [220].

Tabela 6 Średnie wartości gęstości prądu uzyskane podczas eksperymentów w zależności od użytego materiału anodowego.

Inokulat	Rodzaj reaktora	Źródło węgla	Zadany potencjał względem Ag/AgCl	Materiał anod	Średnia gęstość prądu (mA·cm ⁻²)	Źródło
Gleba z parkingu publicznego (Wrocław, Polska) + <i>Geobacter sulfurreducens</i>	Baterijny szklany reaktor	0,05 % v/v ropa naftowa, 10 mM octan sodu	-0,301 V	Gąbka grafitowa	0,516 ± 0,028	Ta praca
				Welon z włókna węglowego	0,553 ± 0,015	
				Welna ze stali nierdzewnej	0,778 ± 0,055	
		0,05 % v/v ropa naftowa		Gąbka grafitowa	0,007 ± 0,004	
				Welon z włókna węglowego	0,008 ± 0,006	
				Welna ze stali nierdzewnej	0,038 ± 0,031	
		przedeegrad- owana 0,05 % v/v ropa naftowa enzymem lakazy		Gąbka grafitowa	0,021 ± 0,012	
				Welon z włókna węglowego	0,020 ± 0,017	
				Welna ze stali nierdzewnej	0,107 ± 0,052	
Oczyszczalnia ścieków Steinhof, Braunschweig, Niemcy	Jednokomorowe MFC	10 mM octan sodu	-0,200 V	Grafit	0,098, ± 0,050	[140]
				Miedź	0,152 ± 0,200	
				Stal nierdzewna	0,067 ± 0,050	
Ścieki browarnicze z <i>Geobacter sulfurreducens</i>	Baterijnego szklanego reaktora	ścieki z browaru	-0,197 V	Welna ze stali nierdzewnej	0,450 ± 0,07	[213]
				Filc grafitowy	0,110 ± 0,040	
				Kartka węglowa	0,090 ± 0,050	
Ścieki rafineryjne z zakładu petrochemicznego	Jednokomorowe MFC	mieszanina 25 mg/L BTEX	0,003 V	Pręt grafitowy	0,125 ± 0,003	[193]
Ścieki rafineryjne	Reaktor bioelektro-chemiczny	25 mg/L toluen	0,003 V	Granulki grafitu	0,057 ± 0,001	[221]
Kompost ogrodowy	3-elektrodowe reaktory elektrochemiczne	10 mM octan sodu	-0,356 V	Tkanina węglowa	0,560	[222]
				Filc węglowy	0,640	

7.2.2 Analiza pomiarów elektrochemicznych

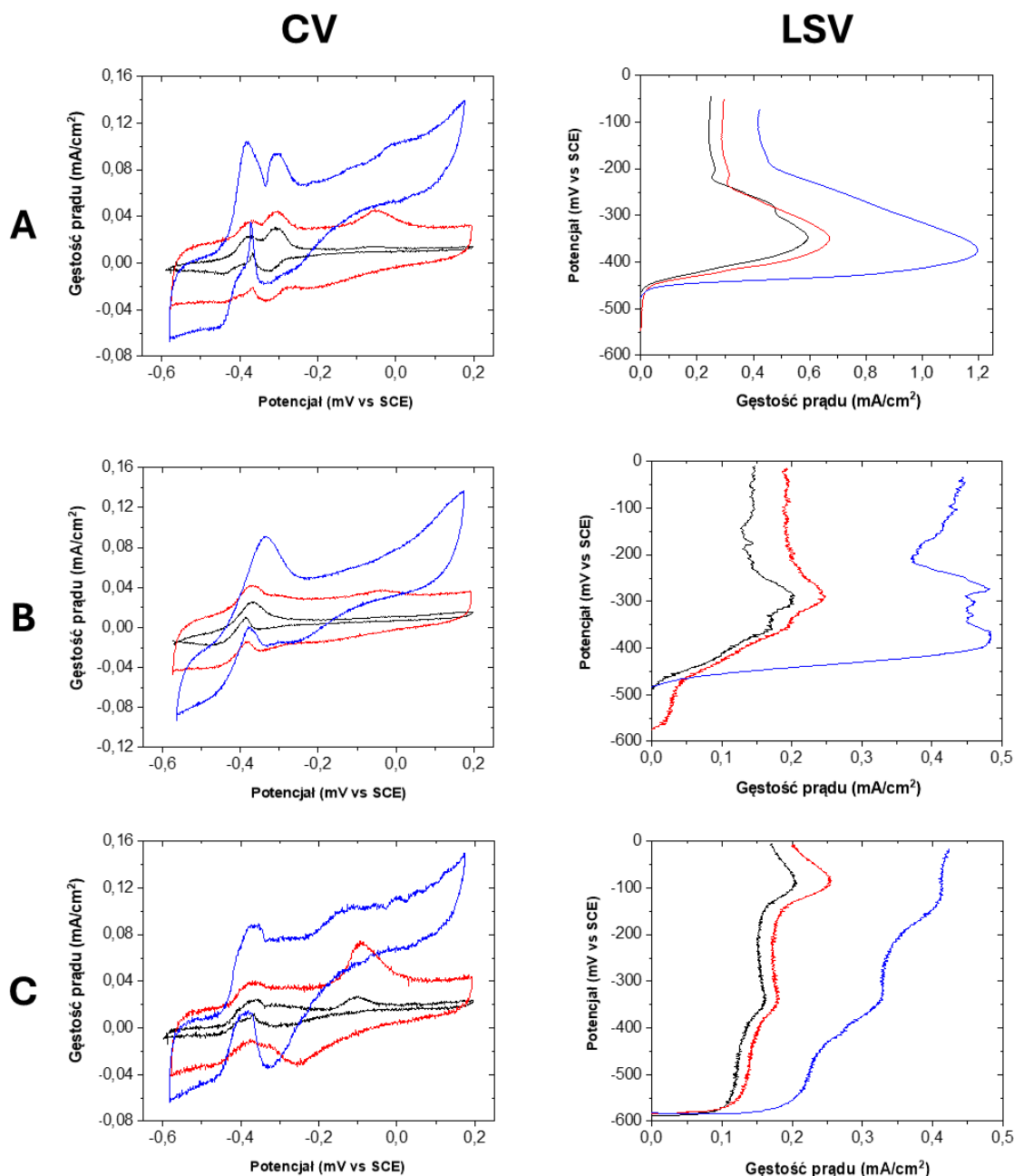
Na rysunku 25 przedstawiono krzywe polaryzacji cyklicznej i liniowej dla trzech różnych materiałów anodowych badanych w eksperymencie. Badanie woltamperometrii liniowej zostało przeprowadzone w momencie generowania prądu o stabilnych i najwyższych wartościach. W celu określenia układów redoks, które nie były związane z reakcjami utleniania i redukcji związków organicznych, badanie woltamperometrią cykliczną przeprowadzono po zakończeniu cyklu zasilania [223,224].

Woltamperometria cykliczna

Pomiary CV w etapie A (octan sodu i ropa naftowa) ujawniły trzy quasi-odwracalne układy redoks przy potencjałach $-0,405 \pm 0,008$ mV, $-0,320 \pm 0,001$ mV oraz $-0,140 \pm 0,009$ mV względem SCE dla każdego materiału. Brak octanu sodu, który wcześniej był głównym źródłem węgla, spowodował zmniejszenie liczby sygnałów pojawiających się na woltamogramach. Dwa układy redoks zaobserwowano przy potencjale: $-0,383 \pm 0,050$ mV oraz $-0,127 \pm 0,003$ mV względem SCE po zasilaniu tylko ropą naftową (etap B) dla każdej elektrody. Pod koniec eksperymentu (etap C) cykliczny woltamperogram uwidoczniał ponownie dwa quasi-odwracalne układy redoks przy potencjale $-0,402 \pm 0,006$ mV oraz $-0,199 \pm 0,019$ mV względem SCE dla każdego materiału.

Identyczne sygnały w pomiarach woltamperometrycznych, widoczne dla różnych materiałów oraz dla różnych etapów zasilania, mogły wynikać z kilku powodów. Mogły nimi być: obecność identycznych narzędzi do transportu elektronów (flawin, cytochromów), dominacja podobnych mikroorganizmów w biofilmie anodowym lub adsorpcja identycznych związków na powierzchni anody. Wytworzone w eksperymencie warunki miały na celu minimalizację błędów pomiędzy przeprowadzanymi pomiarami, co ostatecznie skutkowało bardzo zbliżonymi wynikami pomiarów woltamperometrii cyklicznej.

Dla każdego woltamogramu zaobserwowano dwa sygnały reprezentujące układ redoks. Potencjał formalny tych układów był podobny do opisanego wcześniej potencjału czystych bakterii *Geobacter sulfurreducens* ($-0,400 \pm 0,010$ mV względem SCE) [225]. Sygnały te odpowiadały cytochromowi błony zewnętrznej typu C, odpowiednio OmcB lub OmcZ [200,226]. Dodatkowo *Geobacter sulfurreducens* mógł wykorzystywać pozakomórkowe akceptory elektronów, takie jak Mn(IV), Fe(III), partnerów syntroficznych i elektrody. Wszystkie one mieściły się w przedziale od $+0,157$ do $-0,543$ V względem SCE [227]. Ich obecność wskazywała na wbudowanie bakterii *Geobacter sulfurreducens* w elektroaktywną społeczność biofilmu, która wcześniej została przystosowana do degradacji ropy naftowej. Ponadto eksperyment ten wykazał, że materiał anody nie miał wpływu na kształt woltamperogramu, natomiast miał wpływ na intensywność pojawiających się na nim sygnałów. Prąd o najwyższych wartościach zarejestrowano w następującej kolejności: SSW>CF>GS.



Rysunek 25 Wyniki cyklicznej i liniowej woltamperometrii dla różnych materiałów. Etapy zasilania (A, B, C) są przedstawione na osi pionowej, typ pomiaru elektrochemicznego jest określony na osi poziomej.

Woltamperometria liniowa

Podobnie jak w przypadku danych w czasie rzeczywistym, pomiary LSV wykazały, że najwyższą gęstość prądu ($1,199 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$) zaobserwowano dla SSW zasilanego octanem sodu i ropą naftową. Dla porównania, GS i CF osiągnęły odpowiednio $0,593 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ i $0,674 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ pracując na tym samym substracie. W etapie B zaobserwowano znaczący spadek gęstości prądu. Przy zastosowaniu wyłącznie ropy naftowej w reaktorze wartości gęstości prądu wynosiły $0,484 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$, $0,204 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$, $0,247 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ odpowiednio dla SSW, GS i CF. W etapie C gęstość prądu wynosiła $0,425 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$,

0,211 A·cm⁻² i 0,256 mA·cm⁻² odpowiednio dla SSW, GS i CF. W etapach B i C obserwowane wartości gęstości prądu, obliczone na podstawie LSV, nie różniły się znacząco. Potwierdza to, że gęstość prądu była najwyższa w następującej kolejności: SSW>CF>GS. SSW osiągnęło o 170-220 % wyższą gęstość prądu w porównaniu do materiałów węglowych, niezależnie od zastosowanego substratu.

W przypadku etapu A, gdy głównym substratem był octan sodu, a biofilm nie był jeszcze w pełni rozwinięty (dzień 12 eksperymentu), można było zaobserwować znaczące zmiany krzywej polaryzacji (rysunek 25). To tak zwane zjawisko przeregulowania, które występuje przy wysokim zakresie gęstości prądu i jest związane z metabolizmem biofilmu [124]. Znaczny szum w krzywej polaryzacji zarejestrowano w etapie B, podczas gdy w A i C nie występował. Mogło to wynikać z akumulacji związków ropopochodnych na powierzchni anody, zakładając, że obecność związków pomocniczych, octanu sodu i lakazy prowadzi do lepszej fragmentacji lub dodatkowego procesu syntezy związków pomocniczych takich jak biosurfaktanty. Proces akumulacji ropy naftowej może być korzystny pod względem tworzenia dodatkowych zapasów źródła węgla, ale może również wpływać na wzrost strat transportu z powodu ograniczeń transferu masy. Zastosowanie enzymu lakazy (etap C) jako czynnika rozkładającego węglowodory mogło prowadzić do pojawienia się nowych związków chemicznych, które były łatwiejsze w degradacji dla mikroorganizmów. W artykule M. Karamzadeha i in. opisano, że bardziej złożone substraty mogą wpływać na wzrost strat występujących w ogniwie [228]. Przeciwnie zjawisko obserwowane jest, gdy zastosowane zostaną proste substraty, które są łatwo degradowane przez mikroorganizmy [229]. Dodanie enzymu lakazy zwiększa biodostępność substratów poprzez ich fragmentację, co powinno pozytywnie wpłynąć na degradację i redukcję zanieczyszczeń. Nie zaobserwowano jednak znacznej poprawy w OCV każdej anody po zastosowaniu tego enzymu. Mogło to wynikać z błędu pomiaru, który został wykonany w nieodpowiednim czasie, np. gdy produkcja prądu generowanego przez elektrody malała.

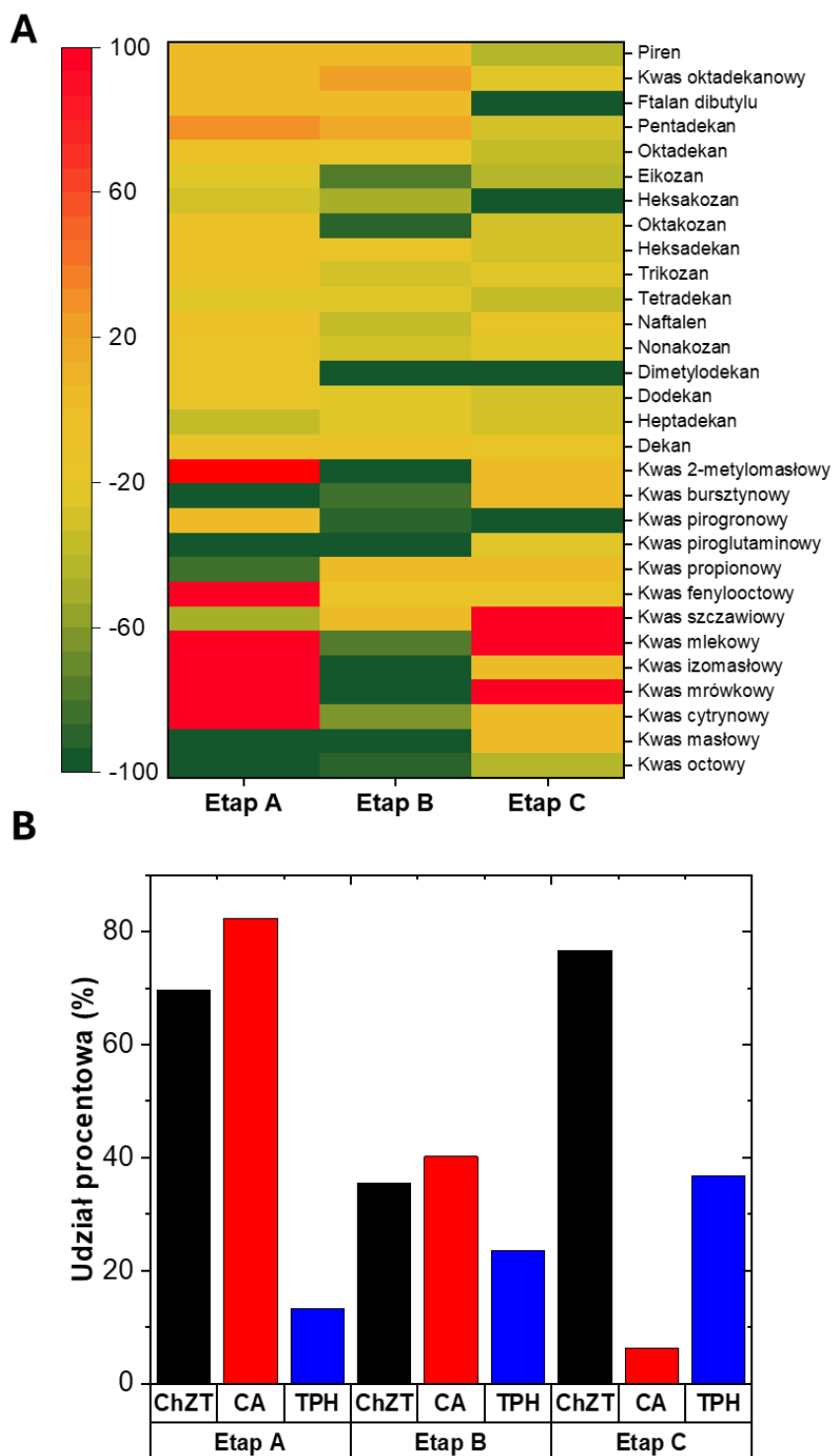
7.2.3 Analiza degradacji związków organicznych w trakcie eksperymentu

Przeanalizowano zmianę wartości ChZT, kwasów karboksylowych (CA) oraz całkowitej zawartości węglowodorów ropopochodnych (TPH) podczas cykli zasilania. Rysunek 26A przedstawia mapę cieplną względnych zmian wykrytych związków podczas cykli zasilania. Ropa naftowa jest mieszaniną wielu węglowodorów alifatycznych i aromatycznych, a jej skład może różnić się pomiędzy próbkami pobranymi w różnych częściach świata [178]. W użytej w eksperymencie ropie naftowej dominującymi składnikami były węglowodory alifatyczne, takie jak dekan, dodekan, heptadekan, tetradekan, heksadekan i ich rozgałęzione pochodne, a także związki aromatyczne, takie jak naftalen, fenantren dibutyli i piren. Wykryto również śladowe ilości kwasów karboksylowych, takich jak kwas propionowy, kwas piroglutaminowy, kwas bursztynowy. Obecność tych związków została opisana między innymi

w badaniach D. Jina, P. Thanahiranya i in. i może zależeć od czynników środowiskowych działających na ropę naftową [230,231].

Rysunek 26B przedstawia porównanie względnych zmian ChZT, CA oraz TPH. W przypadku zastosowania octanu sodu i ropy naftowej, w reaktorze zmniejszono wartość ChZT o 69,6 %, kwasy hydroksylowe zostały usunięte w 82,4 %, a węglowodory zredukowano o 13,2 %. Obecność octanu sodu prowadziła do ograniczonej zdolności usuwania ropy naftowej, ale jednocześnie skutkowała zwiększeniem produkcji prądu wytwarzanego przez konsorcjum mikrobiologiczne w tym przez szczep *Geobacter sulfurreducens*. Bakterie zdolne do degradacji związków ropopochodnych potrzebują dłuższego czasu na adaptację do degradacji węglowodorów, stąd możliwy był niski poziom usunięcia tych związków [232]. Dodatkowo w tym etapie zaobserwowano akumulację kwasu mlekowego, kwasu izomasłowego, kwasu mrówkowego oraz kwasu cytrynowego w elektrolicie. W badaniu C.O. Jeona i in. zostało udowodnione, że niektóre mikroorganizmy, np.: *Clostridium*, w trakcie degradacji związków ropopochodnych w warunkach beztlenowych, mogą produkować kwasy organiczne, które służą jako substraty dla innych populacji fermentujących [233]. Dodatkowo bakterie redukujące siarczany (SRB) zdolne są do degradacji węglowodorów w warunkach beztlenowych przy jednoczesnej produkcji kwasów tłuszczowych jako produktów pośrednich [234,235].

Po wyczerpaniu octanu sodu i zastąpieniu paliwa wyłącznie ropą naftową, produkcja prądu elektrycznego spadła o 95,1 %, przy jednoczesnym wzroście degradacji związków ropopochodnych. W etapie B zaobserwowano zmniejszenie wartości ChZT o 35,4 %, hydroksykwasów o 40,2 % i węglowodorów o 23,6 %. Z analizowanej próbki zniknęły niektóre z kwasów karboksylowych, takie jak: kwas octowy, kwas masłowy, kwas cytrynowy, kwas izomasłowy, kwas mlekowy, kwas bursztynowy. Związki te mogły być pozostałościami metabolitów po poprzednim rodzaju substratu. W tym 12-dniowym okresie przeważała biodegradacja izoalkanów, które są relatywnie bardziej podatne na rozkład przez bakterie w porównaniu do długołańcuchowych alkanów i związków aromatycznych [7].



Rysunek 26 **A** – Względna zmiana stężeń wykrytych związków kwasów organicznych oraz związków ropopochodnych. Skala kolorów wskazuje względną zmianę parametru, gdzie zielony odpowiada degradacji związku, żółty kolor oznacza brak istotnej zmiany, czerwony kolor oznacza akumulacji związku. **B** – Porównanie procentowej zmiany wartości ChZT, zawartości kwasów karboksylowych (CA z ang. carboxylic acids) oraz węglowodorów ropopochodnych (TPH z ang. total petroleum hydrocarbons).

W etapie C enzym lakazy został użyty w celu ułatwienia procesu degradacji związków długołańcuchowych i pierścieniowych występujących w roztworze ropy naftowej. W badaniach T. Diefenbacha i in. wykazano, że zastosowanie tego enzymu wpływa na poprawę szybkości degradacji związków ropopochodnych [236]. W tym etapie osiągnięto zmniejszenie wartości ChZT o 76,6 %, stężenie kwasów karboksylowych spadło o 6,2 %, a całkowita zawartość węglowodorów ropopochodnych o 36,7 %. Wyniki te wskazują, że wykorzystanie lakazy skutkowało najwyższą skutecznością degradacji związków ropopochodnych odnotowaną w tym eksperymencie. Najbardziej zauważalną względną zmianę odnotowano dla naftalenu, oktakożanu, heksadekanu, heksakożanu, dibutylofenantrenu i pirenu. Jak opisano w badaniach A.A. Yaqooba i in. enzym lakazy może degradować organiczne zanieczyszczenia, takie jak fenole, ligniny, barwniki, pestycydy i inne toksyczne związki, których obecność ma wpływ na wartość ChZT. Tak wstępnie przygotowane związki są łatwiejsze w degradacji, co może ułatwiać proces oczyszczenia np. ścieku [236]. Identyczne właściwości zaobserwowano w opisanym powyżej doświadczeniu, gdzie lakaza pozwoliła osiągnąć najwyższą zmianę wartości ChZT w etapie C. Właściwości tego enzymu nie wpłynęły jednak znacząco na poprawę produkcji energii elektrycznej co potwierdzono przez obliczenie wydajności kulombowskiej. CE dla etapu B równe było 4,1 %, podczas gdy w etapie C wynosiło 6,3 %.

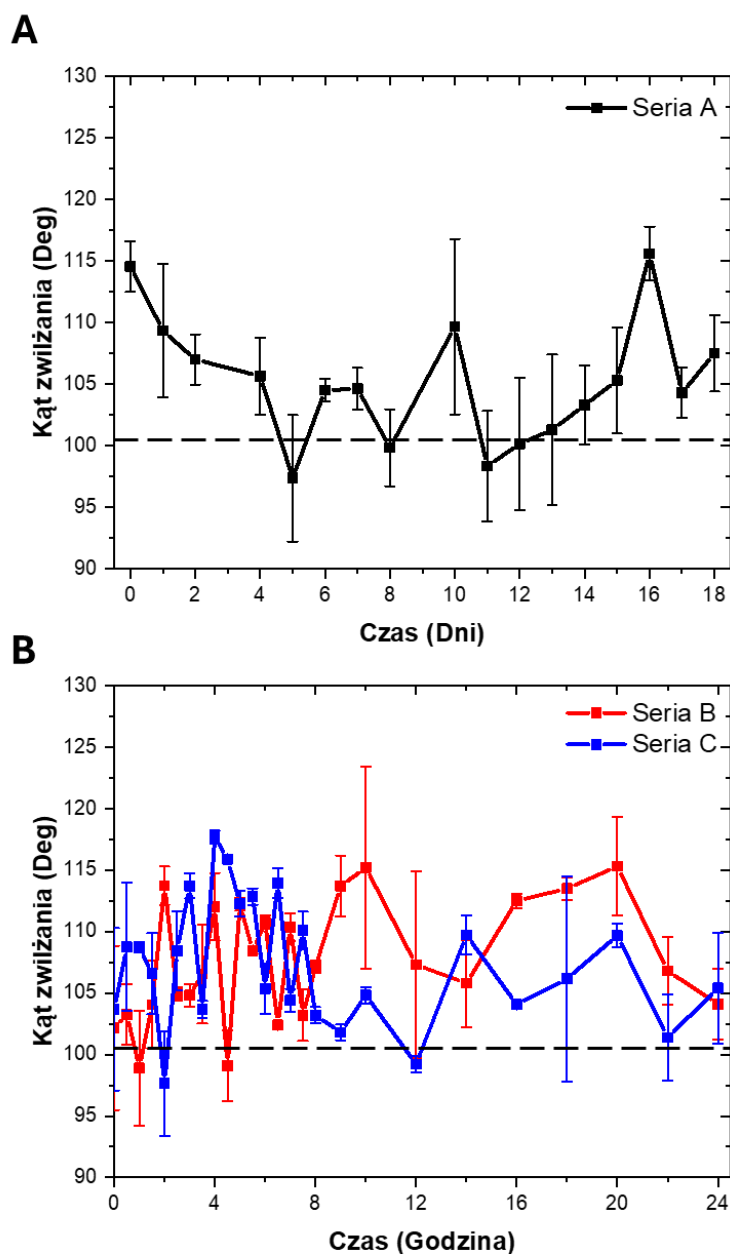
Zastosowanie octanu sodu jako kosubstratu pozwoliło na produkcję prądu elektrycznego o najwyższej gęstości w eksperymencie. Potwierdziła to również wyliczona wydajność kulombowska, która w tym etapie była najwyższa i wynosiła 40,3 %. Chociaż obecność octanu sodu mogła mieć istotny wpływ na tworzenie biofilmu i jego wzmocnienia przez *Geobacter sulfurreducens*, odnotowana wydajność degradacji ropy naftowej była relatywnie niska dla tego etapu. Usunięcie octanu sodu z surowca spowodowało znaczną poprawę w degradacji węglowodorów ropopochodnych, ale jednocześnie zmniejszyło ilość energii wytwarzanej przez reaktor. Zastosowanie enzymu lakazy okazało się najbardziej skutecznym podejściem na zwiększenie poziomu degradacji związków ropopochodnych w tym eksperymencie prowadzonym z wykorzystaniem BES.

7.2.4 Analiza przeprowadzonych pomiarów kąta zwilżania

Na rysunku 27 przedstawiono wykresy zmiany kąta zwilżania anolitu w czasie. Pomiary zostały wykonane dla każdej serii zasilania w trakcie trwania sygnału. Każdy pomiar składał się z trzech powtórzeń, co umożliwiło obliczenie odchylenia standardowego.

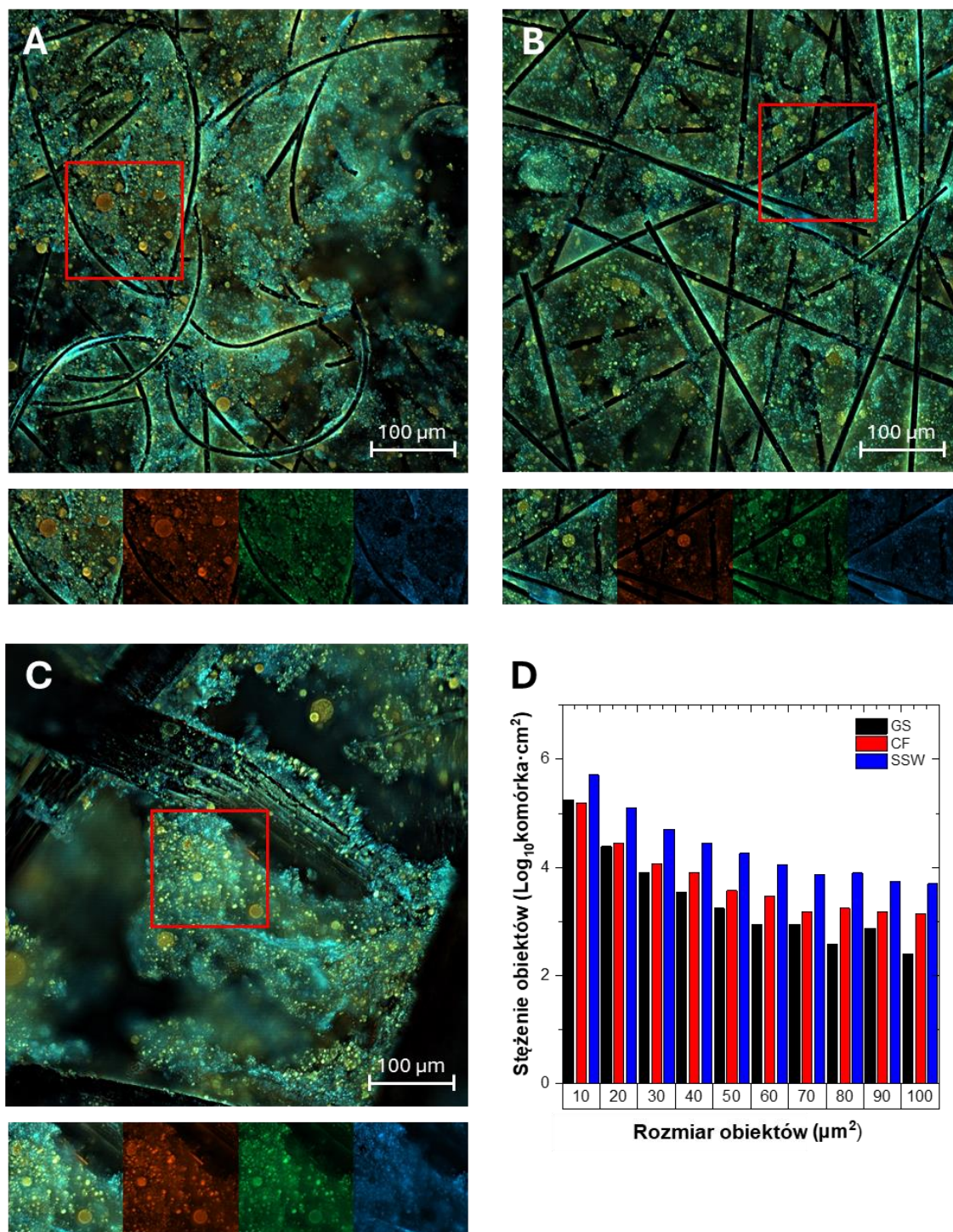
Przedstawione na wykresach dane porównano z referencyjną wartością kąta zwilżania wyznaczoną dla roztworu MSM bez źródła węgla ($100,50^\circ \pm 1,35^\circ$). We wszystkich seriach pomiarowych obserwowano wartości w przedziale od 95° do 125° . W trakcie eksperymentu nie zaobserwowano spadku napięcia powierzchniowego poniżej wartości 95° . Świadczy to o braku występowania biosurfaktantów w badanym roztworze lub o ich znikomym stężeniu. Biosurfaktanty są związkami gromadzącymi się na granicy faz, w tym również na granicy fazy ciekłej i gazowej [237]. W niniejszym eksperymencie zastosowano przepływ gazu obojętnego przez objętość reaktora, co miało służyć

utrzymaniu warunków anaerobowych w reaktorze. Wytworzone w małym stężeniu biosurfaktanty mogły być przez ten gaz wynoszone w kierunku lustra cieczy. Próbkę do analizy pobierane były z dolnej części reaktora, co skutkowało niskim lub zerowym występowaniem biosurfaktantów. Ich niewielka ilość mogła być również wykorzystywana w procesie solubilizacji ropy naftowej.



Rysunek 27 Wykresy zmiany kąta zwilżania w czasie, dla wszystkich serii karmienia, wraz z odchyleniem standardowym dla każdego punktu. Czarną linią przerywaną zaznaczono wartość referencyjną dla MSM bez źródła węgla. Rodzajem serii (A, B, C) oznaczono wykorzystywany w eksperymencie substrat: wykres A – seria A (octan sodu i ropa naftowa); wykres B – seria B (ropa naftowa), seria C (ropa naftowa wraz z enzymem lakazy).

7.2.5 Analiza morfologiczna struktury wytworzonego w eksperymencie biofilmu



Rysunek 28 Zdjęcia materiałów uzyskanych z mikroskopu fluorescencyjnego bioanod po eksperymencie. Zdjęcia wykonano przy powiększeniu 250x dla: **A** – gąbki grafitowej, **B** – welonu z włókna węglowego, **C** – welny ze stali nierdzewnej. Czerwonymi kratkami zaznaczono porównany element zdjęcia. **D** – Wykres stężenia obiektów na powierzchni anody uzyskany podczas analizy zdjęć wykonanych dla każdego rodzaju materiału.

Na rysunku 28 (A, B, C) przedstawiono strukturę powierzchni elektrod, na których znajdował się biofilm elektroaktywny wraz z kroplami ropy naftowej. Zastosowana metoda analizy pozwoliła na wizualizację pojedynczych komórek bakteryjnych, mikrokolonii, pozakomórkowych substancji polimerowych (EPS z ang. *extracellular polymeric substances*), a także kropeł ropy naftowej zaadsorbowanych na powierzchni biofilmu i elektrod [238–240]. Na rysunku 28 A, B i C przedstawiono uzyskane w trakcie badań obrazy wraz ze zdjęciami dla pojedynczych sygnałów. Dla obrazów wykonanych w spektrum UV (kolor niebieski) zaobserwowano brak okrągłych obiektów, które były widoczne na pozostałych obrazach (obraz zbiorczy, czerwony i zielony). Powyższe obiekty mogły stanowić krople ropy naftowej zaadsorbowane na powierzchni włókien elektrody oraz na samym biofilmie. Zaadsorbowane krople ropy mogły stanowić dodatkowe rezerwuary związków organicznych dla przeprowadzanych przez mikroorganizmy reakcji chemicznych. Jednak niektóre stężenia substratów mogą być toksyczne i działać wysoce negatywnie na rozwój biofilmu [220]. Porównując materiały elektrod, można zauważyć, że SSW charakteryzowało się największym rozmiarem włókien i większymi odległościami między nimi w porównaniu do materiałów węglowych (GS, CF). Rozmiar włókien miał wpływ na powierzchnię anody, a przez to na rosnący na niej biofilm. W artykule I. Vázquez i in. opisano dodatkową zaletę wełny ze stali nierdzewnej, która posiada możliwość zmiany gęstości upakowania włókien. Może to mieć bezpośredni wpływ na powierzchnię, odległość między sąsiednimi włóknami oraz objętość wolnej przestrzeni między nimi [213]. Wynika z tego, że prosta modyfikacja powierzchni i objętości anody może odgrywać znaczącą rolę w elektrochemicznej wydajności BES. Wyższy stopień upakowania włókien może pozytywnie wpływać na wartość gęstości prądu, wzrost przewodności elektrycznej lub spadek rezystancji samej anody.

Zbadaną powierzchnię anod sprawdzono pod kątem występujących na niej obiektów. Określono ich liczbę, a otrzymane reprezentatywne wyniki przeliczono na jednostkę powierzchni anody. Komórki bakteryjne scharakteryzowano jako obiekty o typowej długości od 2 do 8 μm [238], które zawarto w przedziale $<10 \mu\text{m}$. Pozostałe obiekty zostały rozpoznane jako krople ropy naftowej o różnej wielkości nagromadzone na powierzchni elektroaktywnego biofilmu. Mikroskopowa ocena ilościowa biofilmu wykazała znikomą różnicę między materiałami GS i CF, z gęstością komórek odpowiednio na poziomie $5,24 \log_{10} \text{komórek} \cdot \text{cm}^{-2}$ i $5,21 \log_{10} \text{komórek} \cdot \text{cm}^{-2}$. Wyższą gęstość biomasy odnotowano za to dla materiału SSW, która równa była $5,7 \log_{10} \text{komórek} \cdot \text{cm}^{-2}$. Zagęszczenie komórek na anodach uzyskane w eksperymencie było niższe w porównaniu do badań J. Ruterenga i in. [238]. Może to wynikać z wyższej toksyczności paliwa wobec mikroorganizmów oraz wpływie biosurfaktantów na gęstość biofilmu, a także nagromadzenia się kropelek ropy naftowej w strukturze biofilmu [62]. Zgodnie z opisem w artykule X. Xu i in. mieszanina węglowodorów alifatycznych i aromatycznych w bezpośrednim kontakcie z komórkami może wpływać na wzrost i tempo metabolizmu bakterii [241]. Z drugiej strony, najwyższa liczba kropeł oleju osadzonych na powierzchni elektrody-biofilmu wskazuje na coś przeciwnego. Elektroda wykonana z SSW była najbardziej wydajna pod względem

wytwarzania prądu elektrycznego, posiadała przy tym najwyższą gęstość komórek i kropeł ropy na swojej powierzchni. Może to oznaczać, że lepiej rozwinięty biofilm akumuluje dodatkowo związki ropopochodne w celu zwiększenia ich biodostępności i zachowania ich jako rezerwy dla przyszłych reakcji.

7.2.6 Podsumowanie i wnioski

W eksperymencie zastosowano trzy różne materiały w celu określenia ich wpływu na produkcję prądu w układzie BES. Ponadto użyto kosubstratu octanu sodu oraz enzymu lakazy w celu zbadania ich wpływu na degradację związków ropopochodnych. W eksperymencie anoda wykonana z wełny ze stali nierdzewnej okazała się najbardziej wydajna pod względem produkcji prądu w porównaniu z pozostałymi materiałami na bazie węgla. Materiał ten umożliwił regularne wytwarzanie prądu o najwyższych gęstościach niezależnie od tego, czy ropa naftowa była używana jako jedyny substrat ($0,038 \pm 0,031 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$), czy stosowana z kosubstratem octanu sodu ($0,778 \pm 0,055 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$) i traktowana enzymem lakazy ($0,107 \pm 0,052 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Właściwości SSW (rozmiar włókien oraz odległości między nimi) mogą mieć znaczący wpływ na budowanie gęstego i stabilnego biofilmu. Gęsty biofilm wytworzony na anodzie może adsorbować część substratów wykorzystywanych przez mikroorganizmy, aby zachować je na późniejszy etap procesu. Zjawisko to może wpływać na wydłużenie produkcji prądu w układach bioelektrochemicznych oraz wydłużenie trwania pojedynczego cyklu po zasileniu. Tezę tę potwierdza przeprowadzone badanie mikroskopem fluorescencyjnym, w którym wykazano, że biofilm osadzony na SSW nie tylko był bardziej rozbudowany, ale również posiadał większą liczbę zaadsorbowanych kropeł ropy naftowej w porównaniu do materiałów węglowych.

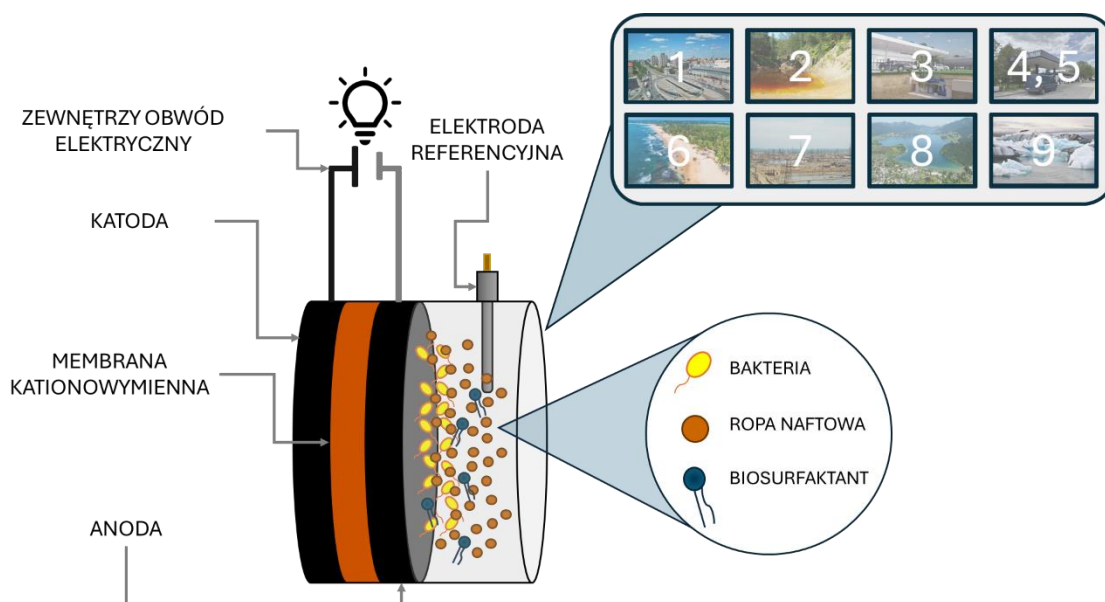
W powyższym eksperymencie obecność octanu sodu i jego metabolitów miała negatywny wpływ na wydajność degradacji węglowodorów ropopochodnych. W etapach, gdzie octan sodu nie był stosowany, obserwowano wyższy stopień degradacji węglowodorów ropopochodnych. Ponadto, strategia zastosowana w końcowej fazie eksperymentu, w której ropa naftowa była wstępnie traktowana enzymem lakazy, spowodowała wzrost degradacji węglowodorów do maksymalnej wartości 36,7 % oraz zmianę wartości ChZT równą 76,65 %. Dodatek tej substancji miał również wpływ na poprawę procesu produkcji prądu, lecz nie zwiększał go znacząco (z 4,1 % do 6,3 % porównując serię B z C).

Mimo że wcześniej opublikowane wyniki badań przedstawiały analizę wpływu materiałów anodowych na produkcję prądu elektrycznego w BES, to w niniejszym eksperymencie po raz pierwszy wykorzystano ropę naftową jako główne źródło węgla. Uzyskane wyniki zapewniają wgląd w mechanizmy interakcji anoda-biofilm-ropa naftowa oraz pozwalają na lepsze zrozumienie wyzwań związanych z zastosowaniem substratów hydrofobowych w układach bioelektrochemicznych i projektowaniem nowych procesów wspomagających ich degradację.

7.3 Badanie środowisk mikrobiologicznych w poszukiwaniu konsorcjum degradującego ropę naftową przy jednoczesnej produkcji biosurfaktantów

7.3.1 Opis przeprowadzonego doświadczenia

W niniejszym eksperymencie jako inokulaty mikrobiologicznych ogniw paliwowych użyto dziewięć środowisk mikrobiologicznych. Ogniwa te zostały zaprojektowane oraz wydrukowane w Laboratorium Mikrobiologicznych Układów Elektrochemicznych Politechniki Wrocławskiej w technologii 3D z polipropylenu (Fiberlogy, Polska). Na rysunku 29 przedstawiono schemat budowy zaprojektowanego mikrobiologicznego ogniwa paliwowego. Miało ono jedną komorę anodową oraz jedną katodę powietrzną (układ jednokomorowy). Wewnętrzna średnica ogniwa wynosiła 1 cm, a szerokość 2 cm. Objętość robocza ogniwa równa była $6,3 \text{ cm}^3$. Okrągła anoda o powierzchni geometrycznej $3,14 \text{ cm}^2$ została przygotowana z welonu węglowego (PRF Composite Materials, Dorset, UK) z drutem stalowym 308 LSi. Katoda została wykonana z węgla aktywnego CWZ-22 ($850 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) z siatką ze stali nierdzewnej jako kolektorem prądu. Powierzchnia katody była równa powierzchni anody. Jako separator pomiędzy anodą a katodą zastosowano membranę kationowymienną (CMI-7000, USA). Na początku eksperymentu zadano rezystancję zewnętrzną (R_{zew}) równą $2 \text{ k}\Omega$. Po każdym pomiarze woltamperometrii liniowej obliczona była optymalna rezystancja w punkcie maksymalnej gęstości mocy, którą dostosowywano na rezystorze zewnętrznym (maksymalnie do $10 \text{ k}\Omega$). Wszystkie pomiary w tym eksperymencie zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej 25°C .



Rysunek 29 Schemat konfiguracji jednokomorowego mikrobiologicznego ogniwa paliwowego użytego w eksperymencie. Zdjęcia lokalizacji pozyskane z Google Maps oraz Google Grafika, licencjonowane na zasadach open source.

Źródła konsorcjów mikrobiologicznych zostały przedstawione w tabeli 7. W celu przeprowadzenia dalszej analizy konsorcja zostały podzielone na trzy kategorie: glebowe środowiska antropogeniczne, gleby azjatyckie, środowiska wodne. Konsorcja mikrobiologiczne pochodziły ze środowisk o zróżnicowanym stopniu zanieczyszczenia węglowodorami. Próbkę glebową przed użyciem przesiano w celu oddzielenia kamieni i korzeni. Do inokulacji gleb przygotowano 10 % roztwory (w/v) oczyszczonej gleby w pożywce z solami mineralnymi (MSM). Próbkę wodną zawierającą zawiesinę do inokulacji przygotowano jako 10 % roztwory (v/v) w MSM po wcześniejszej homogenizacji konsorcjów. Roztwór MSM nie tylko służył jako roztwór soli mineralnych w transporcie źródła węgla, ale również jako elektrolit. Skład MSM oparty został na formule opisanej w publikacji G. Pasternaka i B. Kołwzana [185]. Skład MSM był następujący ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): NH_4Cl (Chempur, Polska) 1,5; Na_2HPO_4 (POCH, Polska) 0,6; KCl (POCH, Polska) 0,1; NaHCO_3 (Chempur, Polska) 2,5; roztwór pierwiastków śladowych o stężeniu $10 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ oraz źródło węgla $\text{CH}_3\text{COOH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Chempur, Polska) $0,82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ i 0,05 % (v/v) ropy naftowej (Seria A) lub 0,05 % (v/v) ropy naftowej (Seria B).

Tabela 7 Wykaz użytych w eksperymencie konsorcjów mikrobiologicznych.

Kategoria konsorcjum	Miejsce pozyskania konsorcjum	Skrócona nazwa konsorcjum wykorzystana w eksperymencie
Glebowe środowiska antropogeniczne	Osad, próbki gleby z kanału ściekowego stacji paliw (woj. Kujawsko-Pomorskie, Polska)	Kanał ściekowy stacji paliw
	Gleba z okolicy skrzynki rozładunku paliwa stacji paliw (woj. Kujawsko-Pomorskie, Polska)	Skrzynka rozładunku paliw
	Szlam, osad, próbki gleby z separatora ropopochodnych stacji paliw (woj. Kujawsko-Pomorskie, Polska)	Separator ropopochodnych
	Gleba z okolic publicznego parkingu na obszarze miejskim Wrocławia (woj. Dolnośląskie, Polska)	Zanieczyszczona gleba miejska
Gleby azjatyckie	Gleba Sri Lanka (Sri Lanka)	Sri Lanka
	Gleba z wulkanu błotnego, (Azerbejdżan)	Azerbejdżan
Środowiska wodne	Próbki wodne z lodowca (Austria)	Woda z lodowca
	Osad oraz próbki wodne z cieków górskiego poniżej lodowca Engelberg (Austria)	Jezioro Austria
	Osad oraz próbki wodne z żółtego jeziora (woj. Dolnośląskie, Polska)	Woda żółte jezioro

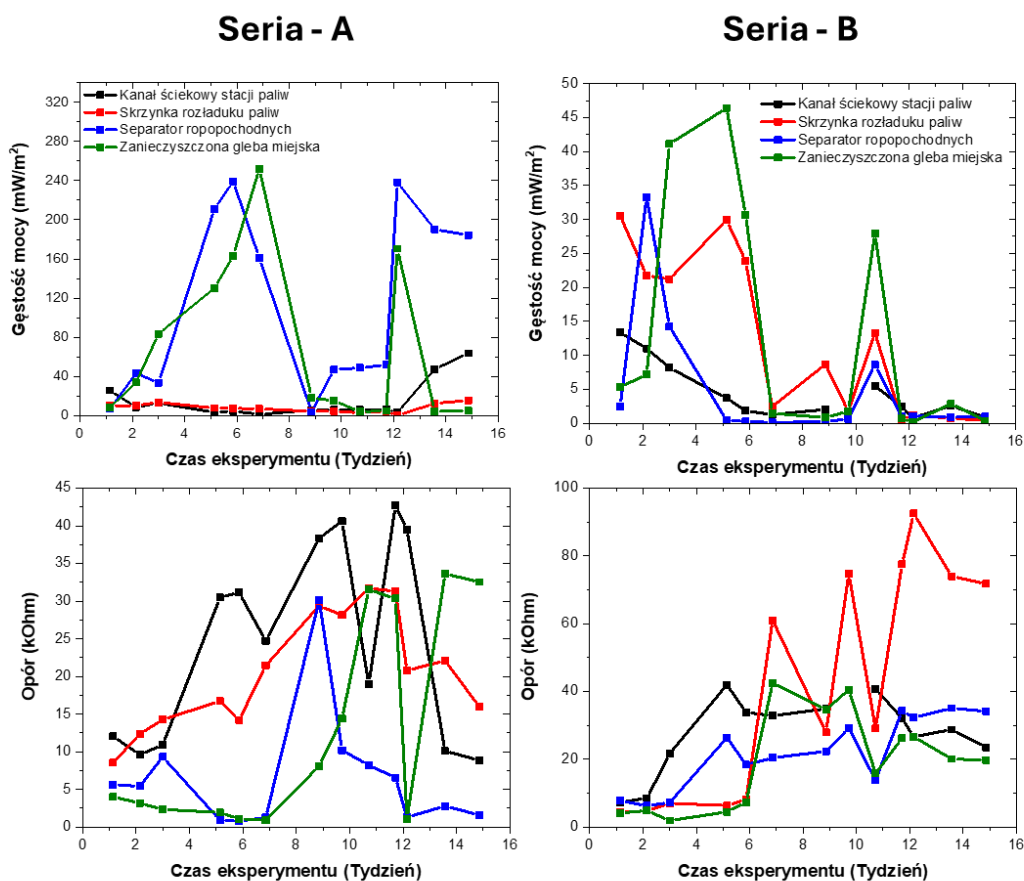
Ropa naftowa użyta w eksperymencie została pozyskana dla Politechniki Wrocławskiej podczas odwiertów w Muzeum Przemysłu Naftowego i Gazowniczego im. Ignacego Łukasiewicza w Bóbrce. Ropa naftowa była bogata w węglowodory alifatyczne, takie jak dekan, dodekan, tetradekan, heksadekan, heptadekan i ich rozgałęzione pochodne, a także związki aromatyczne, takie jak naftalen, fenantren i piren. Wykryta również została śladowa ilość kwasów karboksylowych, takich jak kwas propionowy, piroglutaminowy i bursztynowy. pH MSM było równe 7,5. Wszystkie roztwory zostały przygotowane przy użyciu wody Milli-Q i autoklawowane przed użyciem (121°C, 20 min.). Wszystkie substancje chemiczne użyte do przygotowania pożywek miały 99 % czystości.

Poza procesem wymiany pożywki na nową oraz przeprowadzanymi pomiarami elektrochemicznymi, system akwizycji danych DAQ970A (Keysight) zbierał je w sposób ciągły. Eksperyment monitorowany był w czasie rzeczywistym z trzuminutowym interwałem próbkowania.

7.3.2 Analiza produkcji prądu elektrycznego w trakcie eksperymentu

Eksperymenty woltamperometrii liniowej zostały przeprowadzone w celu scharakteryzowania dynamicznych zmian w procesie produkcji prądu. Na rysunkach 30, 31 i 32 przedstawiono krzywe gęstości mocy i krzywe oporów wewnętrznych w trakcie piętnastotygodniowego eksperymentu. Poniżej zaprezentowano szczegółowe wyniki badań polaryzacyjnych dla wszystkich wykorzystanych w eksperymencie konsorcjów.

Antropogeniczne środowiska glebowe



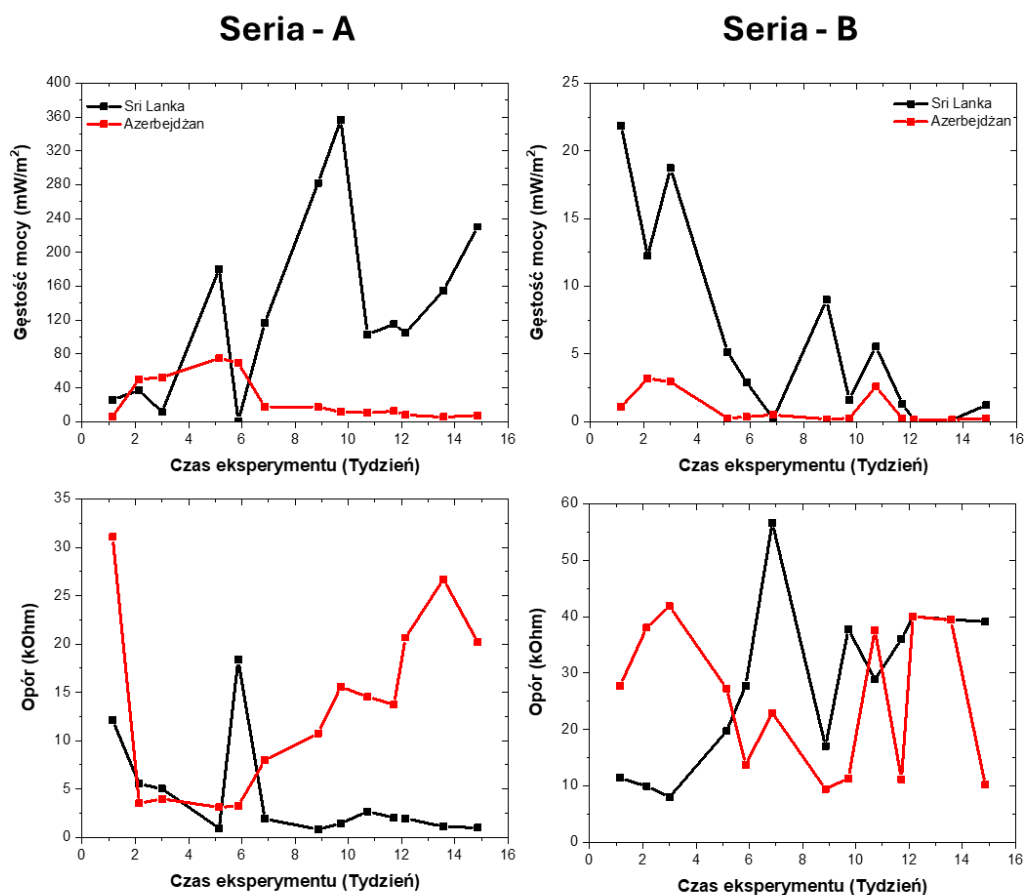
Rysunek 30 Wykresy przedstawiają antropogeniczne środowiska glebowe. Maksymalne wartości gęstości mocy wyliczone dla ogniów wraz z odpowiadającymi im oporami wewnętrznymi. Rodzajem serii (A i B) oznaczono wykorzystywany w eksperymencie substrat: **A** – ropa naftowa z octanem sodu, **B** – ropa naftowa.

Dla konsorcjum gleby separatora ropopochodnych i gleby miejskiej w serii A zaobserwowano stały wzrost wytwarzanej energii elektrycznej, który trwał do 7. tygodnia eksperymentu (rysunek 30). Konsorcja te cechowały się najwyższymi wartościami gęstości mocy zaobserwowanymi w 6. tygodniu – $252,08 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (separator ropopochodnych) i w 7. tygodniu – $239,09 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (zanieczyszczona gleba miejska). Pozostałe konsorcja charakteryzowały się niższymi wartościami gęstości mocy, a ich najwyższe wartości zaobserwowano w 3. tygodniu – $15,76 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (skrzynka rozładunku paliwa) oraz 15. tygodniu – $63,85 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (kanał ściekowy stacji paliw). Dla każdego z ogniów obliczono wartość średniej gęstości mocy w trakcie całego eksperymentu. Wartości te wynosiły: $15,18 \pm 18,54 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (kanał ściekowy stacji paliw), $7,96 \pm 4,33 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (skrzynka rozładunku paliwa), $112,36 \pm 88,13 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (separator ropopochodnych) oraz $68,87 \pm 80,12 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (zanieczyszczona gleba miejska). Mimo że konsorcjum kanału ściekowego charakteryzowało się niższą średnią produkcją prądu elektrycznego w porównaniu do separatora ropopochodnych i gleby miejskiej, to od 12. tygodnia eksperymentu widoczny był trend wzrostowy. Oznacza to, że dopiero po tym czasie konsorcjum zostało dostosowane do warunków produkcji prądu

elektrycznego z wykorzystanego substratu. Dodatkowo w artykule G. Pasternaka i in. zaobserwowano, że im wyższa wartość gęstości mocy, tym niższe opory wewnętrzne ogniwa [242]. Po 7. tygodniu zaobserwowano spadek produkcji prądu elektrycznego przez ogniwa, który był spowodowany wzrostem rezystancji wewnętrznej z 0,93 kOhm (8. tydzień) do 33,63 kOhm (14. tydzień) dla MFC zanieczyszczonej gleby miejskiej. Tak duża zmiana dla ogniwa charakteryzującego się najwyższą wartością gęstości mocy mogła wynikać z akumulacji toksycznych substancji ropopochodnych na powierzchni anody, co opisano w pracy S.J. Varjani [6]. Im większa ilość zakumulowanej ropy w nierozwiniętym biofilmie, tym bardziej malała produkcja prądu. Ogniwa z konsorcjum kanału ściekowego stacji paliw oraz separatora ropopochodnych charakteryzowały się na koniec eksperymentu najniższymi wartościami oporów (8,86 Ω , 1,59 Ω), co przełożyło się na wyższe wartości gęstości mocy w porównaniu do pozostałych konsorcjów.

Konsorcja wykorzystujące wyłącznie ropę naftową jako źródło węgla (seria B) charakteryzowały się znacznie niższymi wartościami gęstości mocy w porównaniu do serii A. Dla kanału ściekowego stacji paliw oraz skrzynki rozładunku paliw zaobserwowano w pierwszym tygodniu eksperymentu najwyższe wartości gęstości mocy, które wynosiły 30,54 $\text{mW}\cdot\text{m}^{-2}$ i 33,27 $\text{mW}\cdot\text{m}^{-2}$. Wartości te mogły wynikać ze znajdujących się w roztworze gleby innych źródeł węgla, które zostały wykorzystane w pierwszych etapach wzrostu biofilmu. Dla pozostałych konsorcjów zaobserwowano sygnały w produkcji prądu w 2. tygodniu – 33,27 $\text{mW}\cdot\text{m}^{-2}$ (separator ropopochodnych) i 5. tygodniu – 46,39 $\text{mW}\cdot\text{m}^{-2}$ (zanieczyszczona gleba miejska). Dla każdego z ogniw obliczono średnią wartość gęstości mocy w trakcie całego eksperymentu. Wartości te wynosiły: $4,12 \pm 4,03 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$ (kanał ściekowy stacja paliw), $12,02 \pm 11,45 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$ (skrzynka rozładunku paliwa), $4,95 \pm 9,10 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$ (separator ropopochodnych) oraz $12,81 \pm 16,45 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$ (zanieczyszczona gleba miejska). Tak niskie wartości średniej gęstości mocy mogły wynikać z akumulacji toksycznych i słabo degradowanych związków ropopochodnych na powierzchni anody. Słabo degradowana ropa mogła tworzyć na powierzchni elektrody wysoce hydrofobową powłokę, która utrudniała budowanie biofilmu. Tezę tę potwierdza fakt, że od 2. tygodnia eksperymentu obserwowany był znaczący wzrost oporów wewnętrznych dla wszystkich ogniw, który trwał do końca eksperymentu. Średni opór wewnętrzny we wszystkich ogniwach zmienił się z $5,09 \pm 1,64 \text{ kOhm}$ (w 2. tygodniu) na $37,31 \pm 20,58 \text{ kOhm}$ (w 15. tygodniu).

Gleby azjatyckie



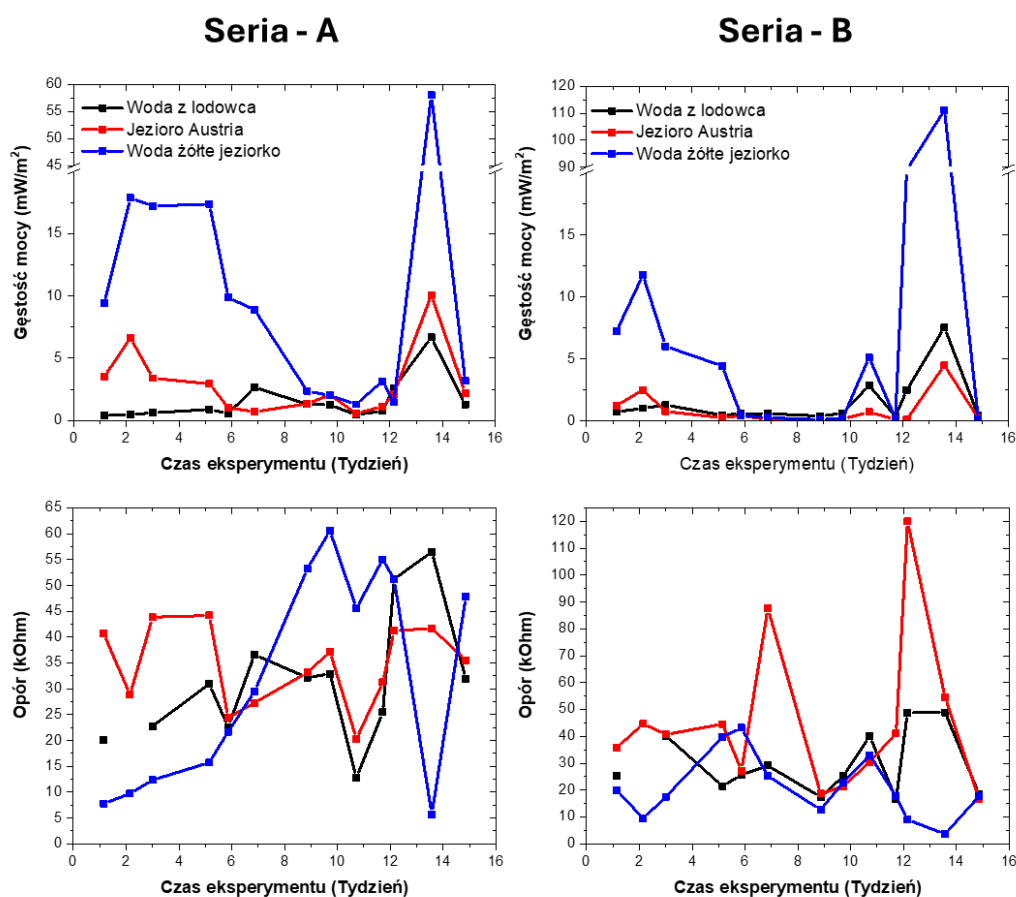
Rysunek 31 Wykresy przedstawiają środowiska gleb azjatyckich. Maksymalne wartości gęstości mocy wyliczone dla ogniów wraz z odpowiadającymi im oporami wewnętrznymi. Rodzajem serii (A i B) oznaczono wykorzystywany w eksperymencie substrat: **A** – ropa naftowa z octanem sodu, **B** – ropa naftowa.

Wykresy maksymalnych wartości gęstości mocy wraz z wyliczonymi oporami wewnętrznymi dla konsorcjów gleb azjatyckich przedstawiono na rysunku 31. Dla serii A (ropa naftowa i octan sodu) wyróżnić można dwa etapy wzrostu biofilmu elektroaktywnego. Etap pierwszy polegał na wzroście produkcji energii elektrycznej, który zazwyczaj związany był ze spadkiem oporów wewnętrznych w ogniwach. Etap drugi polegał na spadku produkcji energii elektrycznej przy jednoczesnym wzroście rezystancji wewnętrznej. Wyszczególniony pierwszy etap wzrostu był widoczny dla obu konsorcjów gleb azjatyckich wraz ze szczytem wartości gęstości mocy. Maksymalną wartość zaobserwowano w 5. tygodniu – $74,90 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (Azerbejdżan) oraz w 9. tygodniu – $356,84 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (Sri Lanka). Od 6. tygodnia eksperymentu widoczny był spadek produkcji prądu elektrycznego przez konsorcjum gleby z Azerbejdżanu i wyliczonych wartości gęstości mocy, związany ze wzrostem oporów wewnętrznych ogniwa. Opór ten zwiększył się z $3,10 \text{ kOhm}$ (6. tydzień) do $26,68 \text{ kOhm}$ (14. tydzień). Identycznej sytuacji nie zaobserwowano dla konsorcjum gleby Sri Lanki, która na koniec eksperymentu charakteryzowała się wysoką wartością gęstości mocy $230,28 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (64,53 % wartości maksymalnej) oraz niskimi oporami wewnętrznymi równymi

0,99 kOhm. Dla każdego z ogniów obliczono średnią wartość gęstości mocy w trakcie całego eksperymentu. Wartości te wynosiły: $124,06 \pm 103,84 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (Sri Lanka), $27,93 \pm 24,87 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (Azerbejdżan).

Seria zasilana wyłącznie ropą naftową (seria B), niezależnie od użytego inokulatu, charakteryzowała się spadkiem produkcji prądu elektrycznego w ogniach. Najwyższe wartości zaobserwowano w 1. tygodniu – $21,87 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (Sri Lanka) oraz w 2. tygodniu – $3,19 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (Azerbejdżan). Fakt ten wynikał z wykorzystania w pierwszych dniach eksperymentu pozostałości materii organicznej znajdującej się na powierzchni wykorzystanej do przygotowania roztworów gleb. Dodatkowo ponownie można było zaobserwować zjawisko akumulacji związków ropopochodnych na powierzchni anody, co potwierdzał wzrost oporu wewnętrznego obu ogni. Dla każdego z ogniów obliczono średnią wartość gęstości mocy w trakcie całego eksperymentu. Wartości te wynosiły: $6,57 \pm 7,14 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (Sri Lanka), $0,98 \pm 1,14 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (Azerbejdżan). Wartości te były znacząco niższe od tych uzyskanych dla serii A. Świadczyć to mogło o tym, że konsorcja mikrobiologiczne nie były przystosowane do degradacji związków ropopochodnych.

Środowiska wodne



Rysunek 32 Wykresy przedstawiają środowiska cieków wodnych. Maksymalne wartości gęstości mocy wyliczone dla ogniów wraz z odpowiadającymi im oporami wewnętrznymi. Rodzajem serii (A i B) oznaczono wykorzystywany w eksperymencie substrat: **A** – ropa naftowa z octanem sodu, **B** – ropa naftowa.

Wykresy maksymalnych gęstości mocy w trakcie polaryzacji wraz z odpowiadającymi im oporami wewnętrznymi dla środowisk cieków wodnych przedstawiono na rysunku 32. Dla serii A zaobserwowano najwyższe gęstości mocy ogniw dopiero w 14. tygodniu eksperymentu. Zjawisko to jednak nie było długotrwałym trendem, lecz pojedynczą aberracją. Wartość gęstości mocy ogniw w 13. i 15. tygodniu była znacząco niższa niż w tygodniu 14. Niemniej jednak dla pomiaru w 14. tygodniu zaobserwowano maksymalne wartości gęstości mocy wynoszące: $6,68 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (woda z lodowca), $10,07 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (jezioro Austria), $58,07 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (woda żółte jeziorko). Dodatkowo dla każdego z ogniw obliczono średnią wartość gęstości mocy w trakcie całego eksperymentu. Wartości te wynosiły: $1,54 \pm 1,65 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (woda z lodowca), $2,90 \pm 2,59 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (jezioro Austria), $11,71 \pm 14,69 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (woda żółte jeziorko).

Badania dla serii B również charakteryzowały się niskimi wartościami gęstości mocy w trakcie eksperymentu oraz jednorazowym sygnałem w 14. tygodniu eksperymentu. W tym okresie zaobserwowano maksymalne gęstości prądu wynoszące: $7,53 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (woda z lodowca), $4,48 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (jezioro Austria), $111,16 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (woda żółte jeziorko). Tak samo, jak dla poprzednich prób, obliczono średnią wartość gęstości mocy w trakcie całego eksperymentu. Wartości te wynosiły: $1,48 \pm 1,91 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (woda z lodowca), $0,85 \pm 1,23 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (jezioro Austria), $12,99 \pm 28,97 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (woda żółte jeziorko).

Tak niskie wartości produkowanego prądu dla serii A oraz B pozwalają wnioskować, że konsorcja te nie przystosowały się przez czas trwania eksperymentu do produkcji prądu elektrycznego. Mogło to wynikać z charakteru składu środowisk mikrobiologicznych, w których znajdowała się mała ilość mikroorganizmów elektroaktywnych. Dodatkowo możliwe, że konsorcja te nie posiadały producentów biosurfaktantów, którzy znacząco mogliby wpłynąć na dostępność związków ropopochodnych.

Podsumowanie

Każde ze środowisk użytych w doświadczeniu rozwijało się w inny sposób, co zaprezentowano na powyższych wykresach. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na rozwój biofilmu i ilość produkowanego przez niego prądu elektrycznego był rodzaj źródła węgla. W tabeli 8 przedstawiono zebrane dane o wartościach gęstości mocy wyliczonych dla ogniw w trakcie eksperymentu. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe serii A charakteryzowały się wyższymi wartościami gęstości mocy oraz niższymi oporami wewnętrznymi względem Serii B. Dodatek prostego substratu wpłynął pozytywnie na szybkość wzrostu biofilmu [228], co mogło znacząco przełożyć się na czas adaptacji ogniw do usuwania trudno degradowanych związków. Dodatkowo konsorcja glebowe (antropogeniczne oraz azjatyckie) charakteryzowały się wyższą wydajnością w procesie produkcji prądu w porównaniu do konsorcjów środowisk wodnych. Wpływ na to mogła mieć bogata różnorodność oraz większa gęstość mikroorganizmów w środowiskach glebowych w porównaniu do wód powierzchniowych [243] oraz pozostałości związków organicznych zakumulowanych na matrycy glebowej wykorzystywanych w pierwszych dniach wzrostu biofilmu [244]. Dzięki tym właściwościom konsorcjów glebowych ogniwa mogły szybciej wytworzyć elektroaktywny biofilm zdolny do degradacji związków ropopochodnych.

W literaturze opisano system remediacji bioelektrochemicznej wykorzystujący związki ropopochodne z oleju napędowego jako źródło węgla. W eksperymencie przeprowadzonym przez K. Venkidusamy'ego i in. osiągnięto degradację ropopochodnych równą 83,4 % oraz maksymalne wartości gęstości mocy równe $15,04 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ dla wcześniej niekondycjonowanej anody [245]. W badaniu O. Adelaja i in. wykorzystano roztwór fenantrenu i benzenu w celu zasilenia mikrobiologicznego ogniwa paliwowego. W eksperymencie osiągnięto maksymalną wartość gęstości mocy równą $6,75 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$. Badania przeprowadzono w mikrobiologicznych ogniwach jedno- i dwukomorowych [246]. Badania P. R. Sheikhyousefiego, G. Mohanakrishna i in. wykonane dla syntetycznego roztworu zawierającego związki ropopochodne wykazały zdolność do produkcji prądu elektrycznego o wartościach gęstości mocy równych $3,5 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ [247] i $222 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ [248]. W eksperymencie S. Sevda i in. sprawdzono wydajność procesu produkcji energii elektrycznej przez mikroorganizmy w trakcie degradacji zanieczyszczeń ze ścieku wodnego po procesie rafinacji. W eksperymencie tym uzyskano wartość gęstości mocy równą $109,62 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ [249]. W trakcie opisanego w niniejszej pracy eksperymentu konsorcja glebowe Sri Lanka, separator ropopochodnych oraz zanieczyszczona gleba miejska charakteryzowały się najwyższymi wartościami generowanego prądu.

Tabela 8 Zestawienie wartości gęstości mocy dla ogniw w trakcie eksperymentu.

Konsorcjum mikrobiologiczne	Rodzaj substratu (A – ropa naftowa + octan sodu; B – ropa naftowa)	Maksymalna gęstość mocy ($\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$)	Czas wystąpienia maksymalnej gęstości mocy (tydzień)	Średnia gęstość mocy ($\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$)
Kanał ściekowy stacji paliw	A	63,85	15	$15,18 \pm 18,54$
	B	30,54	1	$4,12 \pm 4,03$
Skrzynka rozładunku oleju	A	15,76	3	$7,96 \pm 4,3$
	B	33,27	1	$12,02 \pm 11,45$
Separator ropopochodnych	A	252,08	6	$112,36 \pm 88,13$
	B	33,27	2	$4,95 \pm 9,10$
Zanieczyszczona gleba miejska	A	239,09	7	$68,87 \pm 80,12$
	B	46,39	5	$12,81 \pm 16,45$
Azerbejdżan	A	74,90	5	$27,93 \pm 24,87$
	B	3,19	2	$0,98 \pm 1,14$
Sri Lanka	A	356,84	9	$124,06 \pm 103,84$
	B	21,87	1	$6,57 \pm 7,14$
Woda z lodowca	A	6,68	14	$1,54 \pm 1,65$
	B	7,53	14	$1,48 \pm 1,91$
Piach z jeziora Austria	A	10,07	14	$2,90 \pm 2,59$
	B	4,48	14	$0,85 \pm 1,23$
Woda żółte jeziorko	A	58,07	14	$11,71 \pm 14,69$
	B	111,1	14	$12,99 \pm 28,97$

Dane uzyskane w przeprowadzonym eksperymencie wykazały wysoką aktywność konsorcjów mikrobiologicznych do produkcji prądu elektrycznego, szczególnie Sri Lanki, separatora ropopochodnych oraz zanieczyszczonej gleby miejskiej. Konsorcjum z separatora ropopochodnych osiągnęło maksymalną gęstość mocy wynoszącą $252,08 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, a konsorcjum zanieczyszczonej gleby miejskiej $239,09 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$.

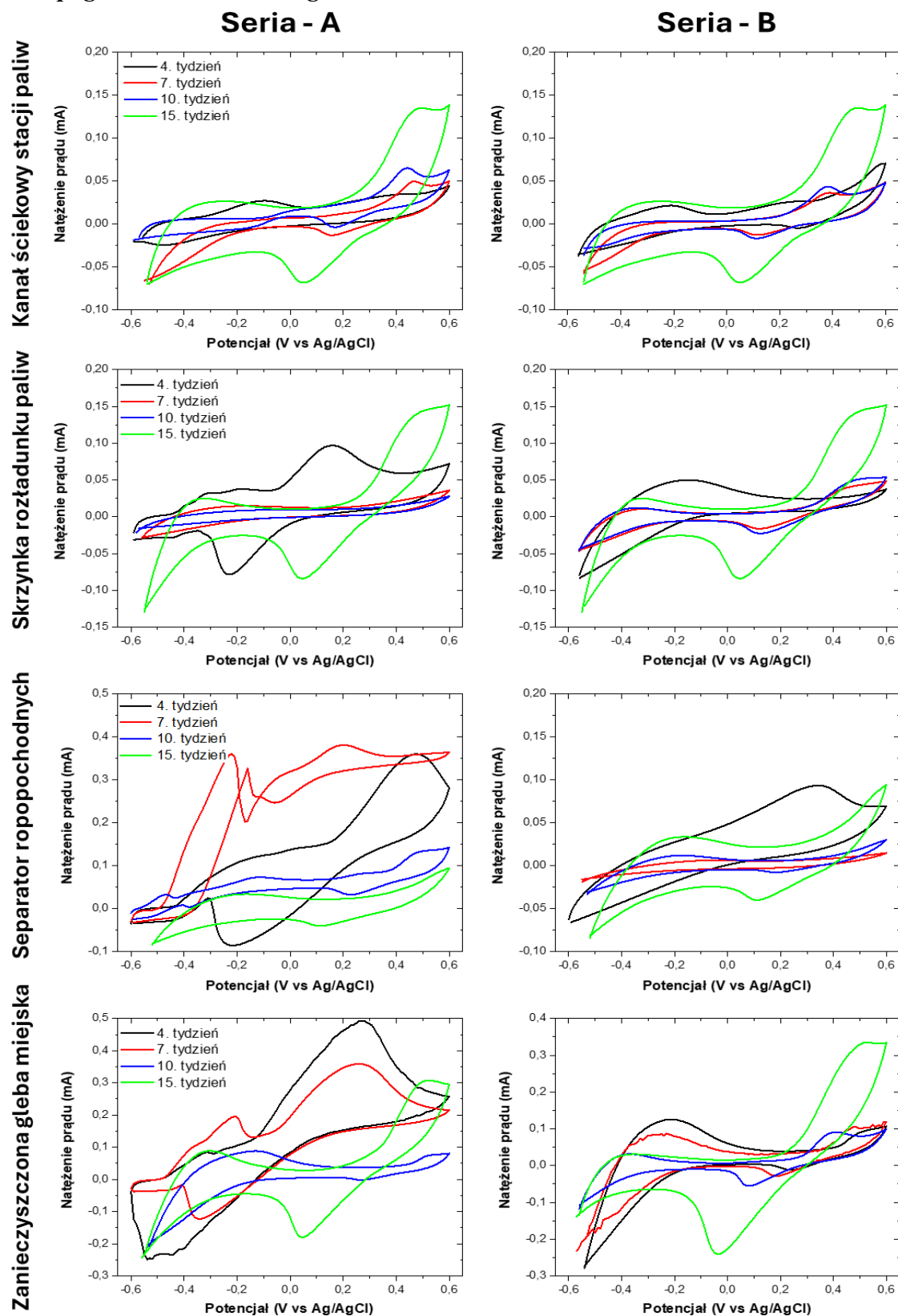
Najwyższą wartość gęstości mocy w tym eksperymencie zaobserwowano dla konsorcjum ze Sri Lanki, która wyniosła $356,84 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$. Wysoka średnia wartość gęstości mocy dla każdego z tych konsorcjów glebowych pozwala wnioskować, że były one bogate w mikroorganizmy zdolne do degradacji związków ropopochodnych oraz potencjalnych producentów biosurfaktantów. Tak złożony pod względem ilości związków substrat nie jest łatwy w degradacji. Oznacza to, że konsorcja te charakteryzowały się również wysokim stopniem adaptacji, a przez to znalazły zastosowanie układach bioelektrochemicznych. Potwierdzają to uzyskane wartości gęstości mocy, które były wyższe niż te uzyskane dla fenantrenu i benzenu [246], roztworów syntetycznych [247,248] oraz rzeczywistego ścieku rafineryjnego [249].

7.3.3 Analiza pomiarów elektrochemicznych

Woltamperometria cykliczna

Na rysunkach 33, 34 oraz 35 przedstawiono wyniki badań woltamperometrii cyklicznej wykonanej dla wszystkich ogniów w 4., 7., 10. i 15. tygodniu eksperymentu. Badania te zostały przeprowadzone w celu określenia aktywności redoks elektroaktywnego biofilmu oraz jego zmian w czasie eksperymentu. Poniżej przedstawiono szczegółowe wyniki badań dla wszystkich wykorzystanych w eksperymencie konsorcjów.

Antropogeniczne środowiska glebowe



Rysunek 33 Wykresy przedstawiają antropogeniczne środowiska glebowe. Woltamogramy cykliczne układów bioelektrochemicznych w 4., 7., 10. i 15. tygodniu eksperymentu. Rodzajem serii (A i B) oznaczono wykorzystywany w eksperymencie substrat: A – ropa naftowa z octanem sodu, B – ropa naftowa.

Woltamogramy cykliczne konsorcjum kanału ściekowego stacji paliw zmieniały swój kształt w czasie trwania eksperymentu (rysunek 33) oraz zależały od użytego substratu. Dla serii A po 4. tygodniu eksperymentu zaobserwowano dwa układy redoks o potencjałach formalnych -0,286 i 0,328 V względem Ag/AgCl. W trakcie kolejnych pomiarów w 7., 10. i 15. tygodniu eksperymentu zaobserwowano jeden układ redoks o potencjale formalnym 0,294 V względem Ag/AgCl. Zmiana ta mogła wynikać z dostosowania się szlaków metabolicznych wykorzystywanych przez mikroorganizmy elektroaktywne do degradacji źródła węgla. Dla serii B układy redoks charakteryzowały się mniejszą intensywnością, ale wyższą stabilnością niż dla serii A. Zauważalna była wysoka powtarzalność pomiarów ze wzrostem intensywności układu redoks w 15. tygodniu eksperymentu. Dla serii B można było również wyznaczyć trzy układy redoks, które odpowiadały potencjałom formalnym -0,248, 0,344 (4. tydzień) oraz 0,255 V (7., 10., 15. tydzień) względem Ag/AgCl. Podobna aktywność mikroorganizmów dla serii A oraz B wskazywała na wykształcenie podobnych szlaków metabolicznych w procesie degradacji ropy naftowej.

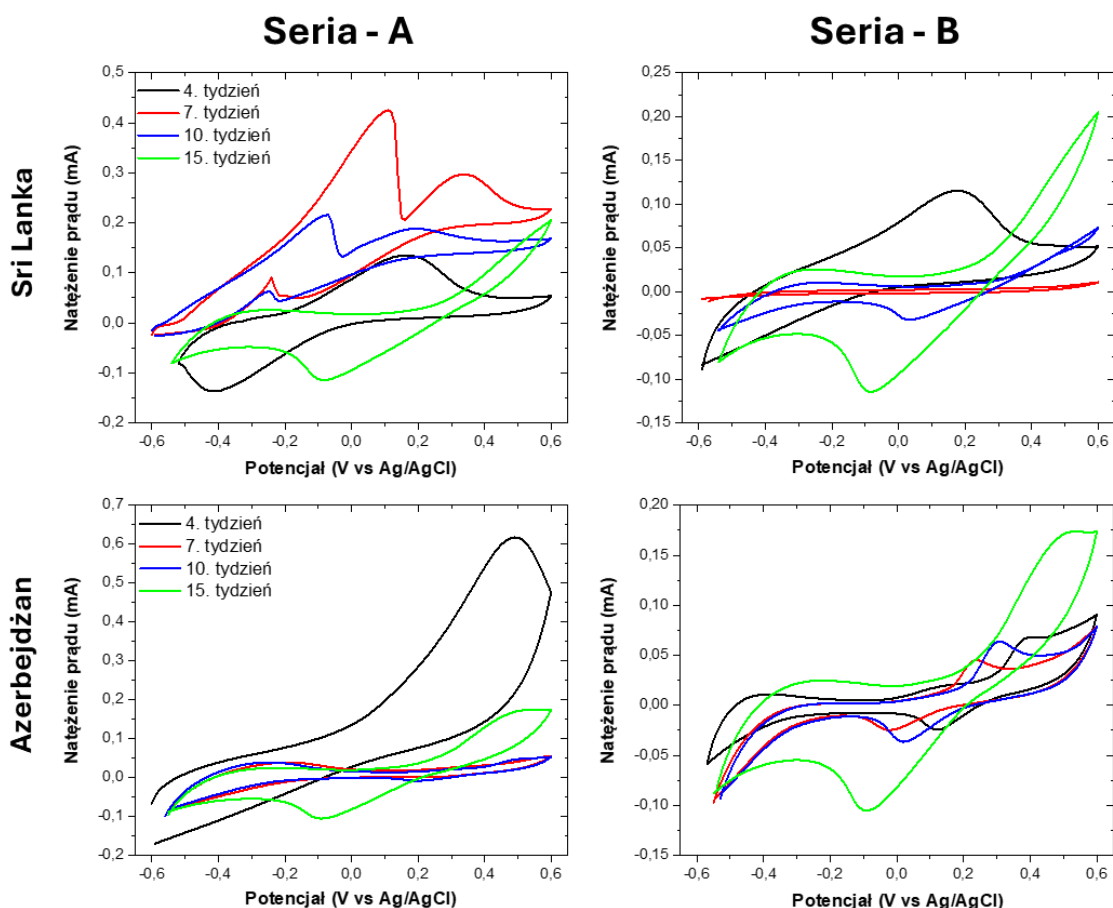
W trakcie analizy woltamogramów konsorcjum skrzynki rozładunku paliw zaobserwowano niską aktywność mikrobiologiczną. Dla serii A widoczny był układ redoks o potencjale formalnym -0,376 mV względem Ag/AgCl w 4. tygodniu eksperymentu. Dalsze badania w 7. i 10. tygodniu charakteryzowały się niską aktywnością mikroorganizmów, która znacząco wzrosła w 15. tygodniu. W tym okresie zauważono jeden układ redoks o potencjale formalnym 0,288 V względem Ag/AgCl. Dla serii B zaobserwowano ponownie spadek aktywności redoks względem serii A. Mimo niskiej intensywności sygnałów, zaobserwowane zostały układy redoks o potencjale formalnym 0,294 mV względem Ag/AgCl w 7., 10. i 15. tygodniu.

Konsorcjum separatora ropopochodnych charakteryzowało się wysoką wydajnością produkcji prądu elektrycznego. Dla serii A w 4. tygodniu eksperymentu zaobserwowano jeden układ redoks o potencjale formalnym 0,124 V względem Ag/AgCl. W 7. tygodniu dla tej serii zaobserwowano zmiany w kształcie woltamogramu, które mogły być związane ze zjawiskiem przeregulowania. W trakcie dalszej analizy wykryto dwa układy redoks o potencjałach formalnych -0,251 i 0,361 mV (tydzień 10.) względem Ag/AgCl. Zastosowanie wyłącznie ropy naftowej w serii B skutkowało niską intensywnością otrzymanych sygnałów. Oznacza to, że na powierzchni anody nie został wytworzony elektroaktywny biofilm zdolny do produkcji prądu w trakcie procesu degradacji związków ropopochodnych. Powyższe woltamogramy (rysunek 33) charakteryzowały się wyłącznie pojedynczymi sygnałami oksydacyjnymi (7. tydzień – 0,339 V względem Ag/AgCl) oraz redukcyjnymi (10. tydzień – 0,176 V i 15. tydzień – 0,109 V względem Ag/AgCl), które nie tworzyły wspólnego układu redoks.

Konsorcjum zanieczyszczonej gleby miejskiej charakteryzowało się sygnałami o wysokiej intensywności w pierwszych tygodniach eksperymentu, która stopniowo malała w następnych tygodniach. Dla serii A w 4. tygodniu zaobserwowano jeden układ redoks – 0,066 V względem Ag/AgCl. W dalszej części badań wykryto nowe układy redoks: -0,322 oraz -0,046 V (tydzień 7.), 0,393 V (tydzień 10.) oraz 0,276 V względem Ag/AgCl.

Dla serii B zaobserwowano wzrost intensywności wykrytych sygnałów w trakcie pomiarów. W tej serii zaobserwowano maksymalnie po jednym układzie redoks na woltamogramie. Dla pomiaru w 7. tygodniu wykryto sygnał o potencjale formalnym 0,379 V względem Ag/AgCl. Dalsze pomiary w 10. i 15. tygodniu umożliwiły wykrycie jednego wspólnego układu redoks o potencjale 0,240 V względem Ag/AgCl.

Gleby azjatyckie

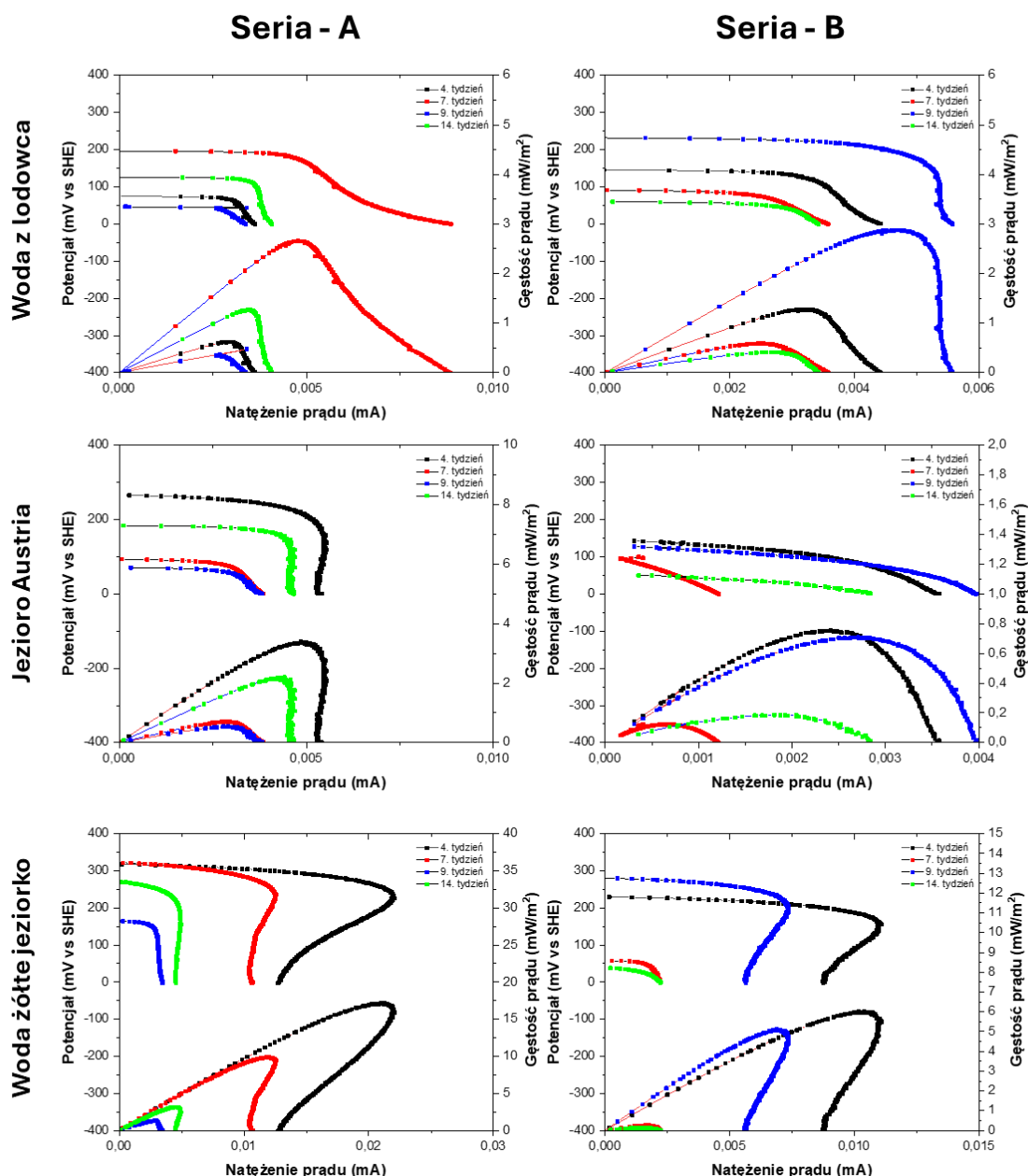


Rysunek 34 Wykresy przedstawiają środowiska gleb azjatyckich. Woltamogramy cykliczne układów bioelektrochemicznych w 4., 7., 10. i 15. tygodniu eksperymentu. Rodzajem serii (A i B) oznaczono wykorzystywany w eksperymencie substrat: **A** – ropa naftowa z octanem sodu, **B** – ropa naftowa.

Aktywność mikrobiologiczna konsorcjum gleby ze Sri Lanki ulegała zmianom w trakcie całego eksperymentu (rysunek 34). Dla serii A w 4. tygodniu zaobserwowano jeden układ redoks o potencjale formalnym -0,128 V względem Ag/AgCl. W tygodniach 7. i 10. następowała intensyfikacja aktywności mikrobiologicznej. W tym okresie wykryto cztery układy redoks, które odpowiadały potencjałom formalnym -0,141 V; 0,090 V (tydzień 7.), oraz -0,234 V; 0,017 V (tydzień 10.) względem elektrody Ag/AgCl. W trakcie ostatniego pomiaru zaobserwowano układ redoks o potencjale 0,195 V (tydzień 15.) względem Ag/AgCl. Dla serii B zaobserwowano sygnały o niższej intensywności redoks niż dla serii A. W trakcie pomiarów wykryto jeden sygnał utleniający w 4. tygodniu (0,177 V)

oraz dwa układy redoks: w tygodniu 10. (0,260 V względem Ag/AgCl) oraz w tygodniu 15. (0,198V względem Ag/AgCl).

Mikrobiologiczne konsorcjum gleby z Azerbejdżanu podczas trwania eksperymentu charakteryzowało się wyższą aktywnością elektrochemiczną niż konsorcjum ze Sri Lanki. Wskazywała na to większa liczba układów redoks obserwowanych na woltamogramach. Dla serii A w 4. tygodniu zaobserwowano jeden układ redoks o potencjale formalnym 0,493 V względem Ag/AgCl. W trakcie następnych pomiarów zaobserwowano dwa układy redoks o nowych potencjałach formalnych -0,177 (tydzień 7. i 10.), 0,340 V (tydzień 10.) względem Ag/AgCl. Zmiana ta mogła wynikać z adaptacji układu do degradacji związków ropopochodnych. W 15. tygodniu ponownie zaobserwowano układ redoks o potencjale formalnym 0,216 mV względem Ag/AgCl. Dla serii B aktywność elektrochemiczna była niższa w porównaniu do serii A. W badaniach zaobserwowano układy redoks o potencjałach formalnych 0,218 V (tydzień 4. i 15.), 0,103 V (tydzień 7.) oraz 0,166 V (tydzień 10.) względem Ag/AgCl.



Rysunek 35 Woltamogramy cykliczne układów bioelektrochemicznych w 4., 7., 10. i 15. tygodniu eksperymentu. Rodzajem serii (A i B) oznaczono wykorzystywany w eksperymencie substrat: A – ropa naftowa z octanem sodu, B – ropa naftowa. Wykresy przedstawiają środowiska cieków wodnych.

Dla każdego woltamogramu wody z lodowca (rysunek 35) w serii A zaobserwowano sygnały odpowiadające odwracalnym układom redoks. W trakcie trwania eksperymentu dla tej serii zaobserwowano trzy układy redoks. Były to układy o potencjałach formalnych 0,260 V (4. tydzień), 0,156 V (7. i 10. tydzień) oraz 0,218 V (15. tydzień) względem Ag/AgCl. Dla serii B wyraźny był ponownie spadek intensywności obserwowanych sygnałów, co mogło świadczyć o dużym wpływie octanu sodu na rozwój oraz wydajność konsorcjów. Podobnie jak dla serii A zaobserwowano zmiany

w aktywności mikrobiologicznej, które przełożyły się na wystąpienie czterech różnych układów redoks. Były układy o potencjałach formalnych: 0,315 V (4. tydzień), 0,110 V (7. tydzień), 0,150 V (10. tydzień) oraz 0,017 V (15. tydzień) względem elektrody Ag/AgCl.

Dla konsorcjum jeziora w Austrii w serii A zaobserwowano spadek intensywności sygnałów odpowiadających reakcjom utleniania i redukcji. Początkowo wykryty w 4. tygodniu układ redoks o potencjale formalnym 0,279 V względem Ag/AgCl został zastąpiony nowymi, podobnymi do siebie układami redoks: 0,152 V (tydzień 7.) i 0,169 V (tydzień 10.) względem Ag/AgCl. Dla serii A w 15. tygodniu nie zaobserwowano żadnego układu redoks, co mogło świadczyć o degradacji biofilmu pod wpływem toksycznych związków ropy naftowej. Dla serii B zidentyfikowano wyłącznie dwa układy redoks. Były to: 0,277 V (tydzień 10.) oraz -0,003 V (tydzień 15.) względem elektrody Ag/AgCl.

Dla serii A konsorcjum wody z żółtego jeziora zaobserwowano trzy układy redoks w następujących po sobie pomiarach. Były to układy o potencjałach formalnych 0,384 V (tydzień 4.), 0,319 V (tydzień 7.) oraz 0,219 V (tydzień 15.) względem elektrody Ag/AgCl. Dla serii B wykryto mniejszą liczbę sygnałów utleniających oraz redukujących. Dla konsorcjum w tej serii wykryto wyłącznie sygnały 0,193 V (tydzień 7.) oraz 0,261 V (tydzień 10.) względem Ag/AgCl.

Podsumowanie

W tabeli 9 przedstawiono zestawienie formalnych potencjałów dla wykrytych w trakcie badań układów redoks. W przeprowadzonych eksperymentach woltamperometrii cyklicznej zauważono, że we wszystkich analizowanych konsorcjach aktywność mikrobiologiczna była wyraźnie wyższa dla serii A. Otrzymane wyniki świadczą o tym, że dodatek prostego substratu znacząco wpływa nie tylko na produkcję prądu elektrycznego, ale i aktywność utleniająco-redukującą mikroorganizmów, co potwierdzono w badaniach K. Rabaey'ego i in. [250]. Ogniwa pracujące w serii B charakteryzowały się mniejszą ilością układów redoks. Co więcej, w badaniach S. Khana i in. określono, że składniki ropy adsorbowane na powierzchni anody oraz biofilmu wywołują szereg negatywnych zjawisk, takich jak zwiększenie oporu wewnętrznego ogniwa czy zmniejszenie efektywności procesu transportu masy [38]. Dynamika procesów redoks w badanych konsorcjach była wyraźnie zależna zastosowanego rodzaju konsorcjum. Według J. Długosza i in. konsorcja glebowe charakteryzują się większą różnorodnością w porównaniu do konsorcjów środowisk wodnych [243]. Potwierdzono to w badaniach J. Truu i P. Młynarza, z których wynika, że im bardziej złożony biofilm, tym łatwiejszy jest proces degradacji złożonych substratów [251].

Tabela 9 Zestawienie potencjałów formalnych wykrytych układów redoks w trakcie pomiarów voltamperometrii cyklicznej.

Skrócona nazwa konsorcjum mikrobiologicznego	Rodzaj substratu (A – ropa naftowa + octan sodu; B – ropa naftowa)	Potencjał formalny wykrytego układu redoks (V względem Ag/AgCl)			
		Tydzień 4.	Tydzień 7.	Tydzień 10.	Tydzień 15.
Kanał ściekowy stacji paliw	A	-0,286, 0,328	0,294	0,294	0,294
	B	-0,248, 0,344	0,255	0,255	0,255
Skrzynka rozładunku oleju	A	-0,376	-	-	0,288
	B	-	0,294	0,294	0,294
Separator ropopochodnych	A	0,124	-	-0,251, 0,361	-
	B	-	-	-	-
Zanieczyszczona gleba miejska	A	-0,066	-0,322, -0,046	0,393	0,276
	B	-	0,379	0,240	0,240
Sri Lanka	A	-0,128	-0,141, 0,090	-0,234, -0,017	0,195
	B	0,177	-	0,260	0,198
Azerbejdżan	A	0,493	-0,177, 0,340	0,340	0,216
	B	0,218	0,103	0,166	0,217
Woda z lodowca	A	0,260	0,156	0,156	0,218
	B	0,315	0,110	0,150	0,017
Jezioro Austria	A	0,279	0,152	0,169	-
	B	-	-	0,277	-0,003
Woda żółte jezioro	A	0,384	0,319	0,219	-
	B	-	0,193	0,261	-

W artykule K. Joshiego i in. opisano, że szczep *Geobacter sulfurreducens* może wykorzystywać pozakomórkowe akceptory elektronów, takie jak Mn(IV), Fe(III). Mediatory te występują w przedziale od +0,203 do -0,497 V w porównaniu z elektrodą srebrową (Ag/AgCl) [227]. Innymi przykładami potencjałów wykorzystywanych przez cytochromy błony cytoplazmatycznej są: CbcBA (-0,407 V), CbcL (-0,347 V) oraz ImcH (-0,197 V). Cytochromy typu C, takie jak OmcA, OmcB, OmcZ lub cytochromy wraz z pilami przewodzącymi OmcS produkowanymi przez *Geobacter sulfurreducens* również mogą odpowiadać za transport elektronów w szerokim przedziale występowania układów redoks [200,201].

W literaturze opisano wiele mediatorów wykorzystywanych przez mikroorganizmy do transportu elektronów. W badaniu A. Kumara i in. opisano, że układ redoks o potencjale -0,413 V względem Ag/AgCl odpowiadał ryboflawinom wykorzystywanym przez szczep *Shewanella sp.*, *Geobacter sp.* Dodatkowo potencjał -0,423 V względem Ag/AgCl został przypisany do mononukleotydów flawinowych wykorzystywanych przez *Shewanella sp.*, *Escherichia sp.*, *Moorella sp.* [198]. W innym badaniu przeprowadzonym przez D. G. Sandersona i in. układ redoks o potencjale -0,333 V względem Ag/AgCl pochodził od piocyjaniny produkowanej przez szczep *Pseudomonas aeruginosa*. Kolejnymi potencjałami formalnymi dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa* mogły być: -0,353 V

względem Ag/AgCl, pochodzące od fenazy-1-karboksamidu [252] oraz 0,107 V względem Ag/AgCl, pochodzące od azuryny [202]. W badaniu Y. Yanga i in. szczep *Pseudomonas alcaliphila* MBR wykorzystał mediator kwasu fenazy-1-karboksylowego, którego potencjał formalny określono na -0,283 V względem Ag/AgCl [218].

Według B. E. Logana i in. analiza CV układu bioelektrochemicznego ma na celu analityczne ustalenie poziomu produkcji substancji pośredniczącej przez drobnoustroje w bulionie mikrobiologicznym oraz potencjałów redoks mediatorów [109]. Przedstawione powyżej badania wykazały, że w złożonych konsorcjach bardzo trudne jest określenie, który czynnik odpowiada bezpośrednio za transport elektronów. Mnogość mikroorganizmów oraz wykorzystywanych przez nie mediatorów może zmieniać się w czasie eksperymentu w zależności od kondycji biofilmu. Przy analizie należy uwzględnić możliwe sygnały utleniające oraz redukujące pochodzące bezpośrednio od reakcji redoks zachodzącej z udziałem wykorzystanego substratu oraz możliwe przesunięcia potencjału wynikające ze zbyt dużej szybkości skanowania. W zakresie dynamiki zmian układów redoks w czasie, wyniki wskazują, że kondycja biofilmu i dostępność substratów wpływają na aktywność mikroorganizmów. Złożone konsorcja, takie jak te pochodzące z gleby stacji paliw, separatora ropopochodnych i Sri Lanki, mogą wykazywać zmienną aktywność redoks w zależności od warunków eksperymentalnych i kompozycji biofilmu. Dodatkowo obecność składników ropy naftowej na powierzchni anody i biofilmu, również może wpływać na transport elektronów i efektywność degradacji. Obecność producentów biosurfaktantów mogłaby dodatkowo wpłynąć na zdolność konsorcjów do degradacji związków ropopochodnych. Ich obecności w konsorcjach nie można jednoznacznie określić wyłącznie na podstawie wyników woltamperometrii cyklicznej.

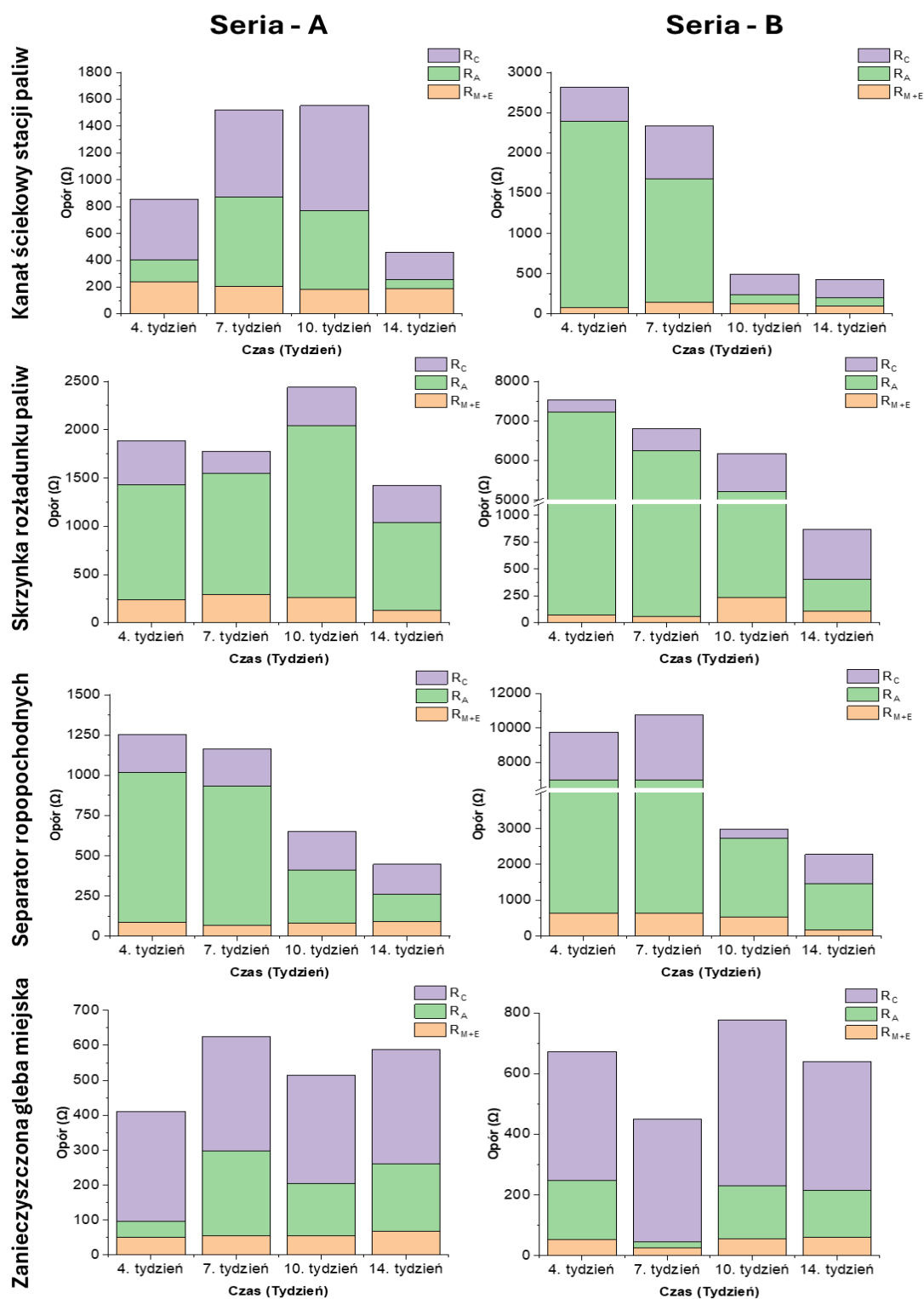
Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna

Analizę EIS przeprowadzono w celu określenia oporów wewnętrznych ogniw. Na rysunkach 36, 37 i 38 przedstawiono w formie wykresów słupkowych udział komponentów na całkowitą rezystancję. Wyniki te dotyczą pomiarów wykonanych w 4., 7., 10. i 15. tygodniu działania układów. Dane uzyskane z pomiarów EIS zostały dopasowane do modelu obwodu zastępczego zaproponowanego przez N. Sekara i in. Model ten zawierał element fazy stałej, który reprezentował pojemnościowe zachowanie podwójnej warstwy elektrycznej wynikające z biofilmu [175]. Co więcej, w modelu uwzględniono element Warburga o skończonej długości [253]. W obwodzie równoważnym element R_A odnosił się do anody, R_C do katody, a R_{M+E} do rezystancji omowej, związanej z użyciem membrany i elektrolitu. Model ten pozwala na analizę większej liczby komponentów odpowiadających za opory wewnętrzne ogniwa w porównaniu do tego użytego w eksperymencie opisanym w rozdziale 7.1.

W trakcie eksperymentu zaobserwowano zmiany w rezystancji wewnętrznej dla każdego z konsorcjów mikrobiologicznych. Jednak nie były one istotnie powiązane z komponentem R_{M+E} , którego wartość była stała i wynosiła $153,36 \pm 93,47 \Omega$ dla wszystkich użytych w eksperymencie ogniw mikrobiologicznych. Opory wewnętrzne

ogniw mikrobiologicznych, szczególnie opór anody (R_A) i opór katody (R_C), wykazywały znaczną zmienność w czasie, co było kluczowe dla oceny wydajność działania tych systemów w produkcji prądu.

Antropogeniczne środowiska glebowe



Rysunek 36 Wykresy przedstawiają dopasowane komponenty do układu zastępczego dla antropogenicznych środowisk glebowych. Dane pozyskane w trakcie badania EIS w 4., 7., 10.

i 14. tygodniu eksperymentu. Rodzajem serii (A i B) oznaczono wykorzystywany w eksperymencie substrat: A – ropa naftowa z octanem sodu, B – ropa naftowa. Na wykresach użyto skrótów oznaczających: R_A – rezystancja anody; R_c – rezystancja katody, R_{M+E} – rezystancja omowa.

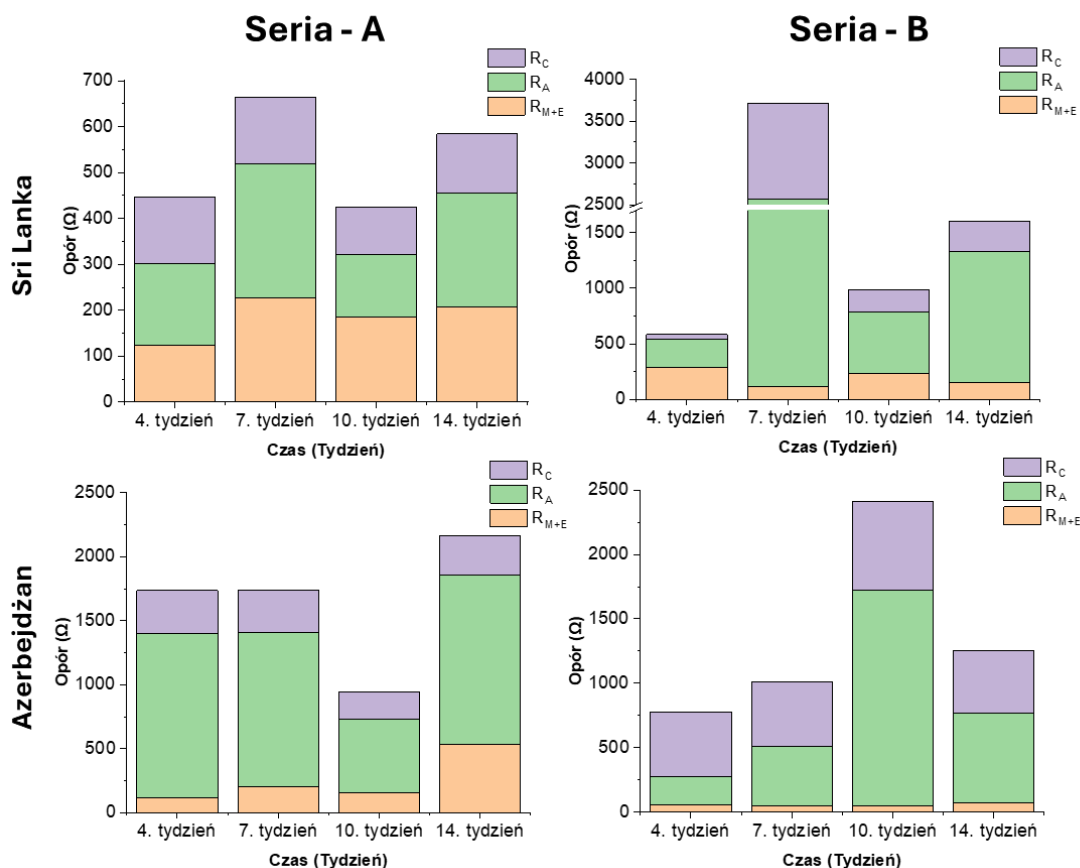
Analiza wyników otrzymanych dla konsorcjum kanału ściekowego stacji paliw (rysunek 36) wykazała, że dla serii A całkowity opór wewnętrzny początkowo wzrastał, osiągając szczyt w 10. tygodniu, po czym nastąpiło znaczne zmniejszenie oporu w 14. tygodniu. Zaobserwowano spadek oporu komponentu R_c i R_A w późniejszych tygodniach eksperymentu, co oznaczać mogło poprawę efektywności elektrochemicznej. W serii B całkowity opór wewnętrzny był początkowo wysoki, z wyraźnym udziałem oporu anody (R_A), jednakże w kolejnych tygodniach zaobserwowano znaczną redukcję oporów tego komponentu. Zjawisko to wskazywało na adaptację mikroorganizmów do trudniejszych warunków eksperymentalnych niż te w serii A. Suma oporów wewnętrznych na koniec eksperymentu dla tego konsorcjum wynosiła 460,67 Ω (seria A) oraz 428,10 Ω (seria B)

Wartość całkowitego oporu wewnętrznego konsorcjum skrzynki rozładunku paliw serii A była początkowo bardzo wysoka. W 4., 7., 10. tygodniu eksperymentu zaobserwowano trend wzrostowy sumy oporów wewnętrznych spowodowanych komponentem R_A . W 14. tygodniu zaobserwowano jednak redukcję wartości tego komponentu, co skutkowało zmniejszeniem całkowitych oporów wewnętrznych ogniwa. Zmiany w wartościach impedancji komponentów układu świadczyły o adaptacji systemów do procesu degradacji związków ropopochodnych. Dla serii B wartość całkowitego oporu była uzależniona od oporu anody. Na przestrzeni całego eksperymentu, opory anody uległy redukcji z 7162,00 Ω do 291,80 Ω , co oznaczać mogło znaczącą poprawę działania ogniwa. Suma oporów wewnętrznych na koniec eksperymentu dla tego konsorcjum wynosiła 1420,80 Ω (seria A) oraz 863,70 Ω (seria B).

Dla separatora ropopochodnych (rysunek 36) serii A komponent anody generował największe opory wewnętrzne. Jednak malał on w kolejnych tygodniach, co mogło wskazywać na poprawę przewodnictwa oraz bardziej efektywną degradację związków ropopochodnych. Podobne zjawisko zaobserwowano dla serii B, gdzie opór wynikający z tego komponentu uległ redukcji z 6340 Ω do 1293 Ω . Suma oporów wewnętrznych na koniec eksperymentu dla tego konsorcjum wynosiła 446,68 Ω (seria A) oraz 2275,65 Ω (seria B).

Analiza konsorcjum zanieczyszczonej gleby miejskiej serii A wykazała stabilne opory komponentu R_c , które na przestrzeni eksperymentu wynosiły $319,35 \pm 7,49 \Omega$. Niewielkim zmianom ulegał komponent anodowy. Mogło to wskazywać na stabilne warunki elektrochemiczne oraz umiarkowaną, ale konsekwentną aktywność mikrobiologiczną. Podobnymi tendencjami charakteryzowało się ogniwo w serii B. Ponownie zaobserwowano stabilne opory dla komponentu katody ($450,75 \pm 56,31 \Omega$) oraz fluktuację komponentu anody (zmiana z 20,70 Ω w tygodniu 7., na 154,25 Ω w tygodniu 14). Suma oporów wewnętrznych na koniec eksperymentu dla tego konsorcjum wynosiła 587,58 Ω (seria A) oraz 640,31 Ω (seria B).

Gleby azjatyckie



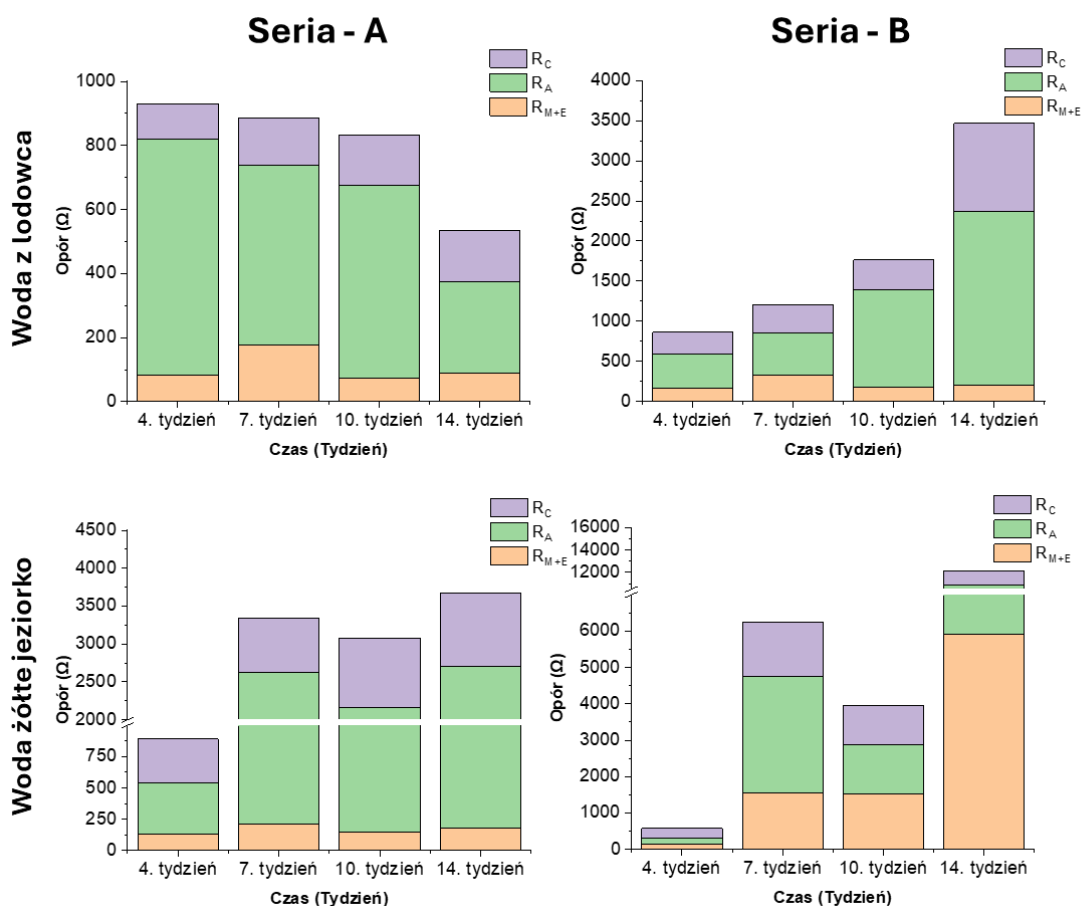
Rysunek 37 Wykresy przedstawiają dopasowane komponenty do układu zastępczego dla środowisk gleb azjatyckich. Dane pozyskane w trakcie badania EIS w 4., 7., 10. i 14. tygodniu eksperymentu. Rodzajem Serii (A i B) oznaczono wykorzystywany w substrat: **A** – ropa naftowa z octanem sodu, **B** – ropa naftowa. Na wykresach użyto skrótów oznaczających: R_A – rezystancja anody; R_C – rezystancja katody, R_{M+E} – rezystancja omowa.

Konsorcjum gleby Sri Lanka (rysunek 37) charakteryzowało się zmianami w oporach komponentu anody. Zmiany te wynikały z dostosowania aktywności elektrochemicznej biofilmu lub gromadzenia się produktów ubocznych na elektrodach. W serii B całkowity opór w trakcie pomiaru w 4. tygodniu był najniższy w serii. Kolejne eksperymenty elektrochemiczne charakteryzowały się tendencją wzrostową komponentu anody oraz katody, z wyraźnym szczytem wartości oporów w tygodniu 7. Opór całkowity w trakcie tego pomiaru wynosił 3715,4 Ω (R_{M+E} – 118,4 Ω; R_A – 2450 Ω; R_C – 1147 Ω). Wskazywać to mogło na trudności mikroorganizmów w adaptacji do degradacji pożywki wyłącznie z samą ropą naftową. W późniejszych tygodniach impedancja uległa znacznemu zmniejszeniu, co wskazywało na adaptację mikroorganizmów. Suma oporów wewnętrznych na koniec eksperymentu dla tego konsorcjum wynosiła 584,04 Ω (seria A) oraz 1598,70 Ω (seria B).

Dla ogniwa wykorzystującego konsorcjum gleby Azerbejdżan (rysunek 37) w serii A zaobserwowano spadek oporu całkowitego w 10. tygodniu. Wskazywać to mogło na poprawę przewodnictwa elektrochemicznego i większą aktywność mikroorganizmów

dostosowanych do degradacji ropopochodnych. Szczególnie widoczny był spadek oporu komponentu anody. Wzrost oporów w 14. tygodniu obserwowany był głównie w komponencie omowym i katodowym. Mogło to wynikać z akumulacji hydrofobowych frakcji ropy naftowej na anodzie oraz membranie, które utrudniały produkcję i transport elektronów w układzie. Dla serii B zaobserwowano liczne zmiany w komponencie anodowym na przestrzeni eksperymentu. W 10. tygodniu opór komponentu anodowego wynosił $1674\ \Omega$, co było ponad 3,5-krotnym wzrostem oporu anody względem pomiaru w 7. tygodniu. W 14. tygodniu zaobserwowano spadek oporów względem tygodnia 10., lecz suma oporów poszczególnych komponentów była wyższa niż ta uzyskana w tygodniu 7. Oznaczać to mogło, że z czasem ogniwo ulegało powolnej degradacji, co rzutowało na pozostałe pomiary elektrochemiczne. Suma oporów wewnętrznych na koniec eksperymentu dla tego konsorcjum wynosiła $2163,70\ \Omega$ (seria A) oraz $1253,80\ \Omega$ (seria B).

Środowiska wodne



Rysunek 38 Wykresy przedstawiają dopasowane komponenty do układu zastępczego dla środowisk cieków wodnych. Dane pozyskane w trakcie badania EIS w 4., 7., 10. i 14. tygodniu eksperymentu. Rodzajem serii (A i B) oznaczono wykorzystywany w eksperymencie substrat: A – ropa naftowa z octanem sodu, B – ropa naftowa. Na wykresach użyto skrótów oznaczających: R_A – rezystancja anody; R_C – rezystancja katody, R_{M+E} – rezystancja omowa.

Analiza oporów wody z lodowca (rysunek 38) serii A wykazała, że początkowo głównym czynnikiem wpływającym na wysokie opory był komponent anodowy, który z czasem malał. Jest to charakterystyczne dla biofilmu, który się rozwija oraz adaptuje do warunków procesu. Odwrotną tendencję zaobserwowano dla serii B tego konsorcjum. Na przedstawionym wykresie zaobserwowano wzrost komponentu anodowego na przestrzeni całego eksperymentu z najwyższą wartością w 14. tygodniu. Świadczyć to mogło o akumulacji trudno rozpuszczalnych związków na powierzchni anody, które nie tylko zwiększały opór, ale jednocześnie ograniczały rozwój biofilmu. W 14. tygodniu zaobserwowano również wzrost komponentu katodowego dla tego ogniwa. Suma oporów wewnętrznych na koniec eksperymentu dla tego konsorcjum wynosiła 533,87 Ω (seria A) oraz 3465,70 Ω (seria B).

W przeprowadzonej analizie pominięto wyniki uzyskane dla konsorcjum mikrobiologicznego z jeziora w Austrii ze względu na brak dopasowania modelu obwodu zastępczego do uzyskanych danych. Przyczyną trudności w modelowaniu mogła być niska aktywność elektrochemiczna biofilmu, co utrudniało precyzyjne określenie parametrów impedancji elektrochemicznej. Oznacza to, że biofilm wytworzony przez to konsorcjum charakteryzował się zbyt niską przewodnością jak i produkcją prądu elektrycznego, co ograniczyło skuteczność w przekazywaniu elektronów do elektrody.

Dla konsorcjum wody żółtego jeziora (rysunek 38) w serii A zaobserwowano trend wzrostowy oporu związanego z komponentem anody. Ponownie, świadczyć to mogło o akumulacji trudno rozpuszczalnych związków na powierzchni anody. Dla serii B zaobserwowano gwałtowne zmiany oporów. Stosunkowo niskie wartości komponentów anody i katody zostały zwiększone w 7. tygodniu pomiarów. Kolejny pomiar w 10. tygodniu wskazywał na stabilizację układu elektrochemicznego w obszarze anodowym. W 14. tygodniu ponownie obserwowalny był znaczący wzrost komponentów omowych oraz anodowych. Tak znacząca zmiana mogła wynikać ze spadku aktywności elektrochemicznej i degradacji elementów układu bioelektrochemicznego. Na koniec eksperymentu wyliczono sumę oporów wewnętrznych dla tego konsorcjum, która wynosiła 3670,30 Ω (seria A) oraz 12106,20 Ω (seria B).

Podsumowanie

Na podstawie eksperymentu EIS wykazano, że dodatek octanu sodu w serii A znacząco obniżył opory wewnętrzne w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych. Przełożyło się to na lepsze warunki elektrochemiczne i zwiększoną wydajność produkcji prądu elektrycznego. Według B. E. Logana i in. dobór substratu pełni kluczową rolę w wydajności energetycznej w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych [119]. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na całkowitą impedancję w obu seriach okazał się opór anody, którego wzrost w późniejszych tygodniach eksperymentu wskazywał na problemy z aktywnością mikroorganizmów oraz nagromadzenie zanieczyszczeń na powierzchni elektrody. W przypadku zastosowania trudnego w degradacji substratu istotne jest, by zapewnić jego jak najlepszą dostępność mikroorganizmom. Dostępność można zwiększyć poprzez zastosowanie związków powierzchniowo czynnych [156] lub mediatorów, które mogą znacząco wpłynąć na

zmniejszenie oporów wewnętrznych ogniwa [254]. Na podstawie wyników można stwierdzić, że mikroorganizmy wykazywały zdolność do adaptacji do trudniejszych warunków substratowych w serii B. Jednakże, w dłuższej perspektywie, wysokie wartości rezystancji obserwowane w późniejszych tygodniach wskazywały na spadek ich aktywności. Według S. Chena i in. w trakcie długoterminowych eksperymentów należy stosować substrat o optymalnym składzie (niezawierający związków o wysokiej toksyczności dla mikroorganizmów) lub stosować bogate i różnorodne konsorcja mikrobiologiczne [255]. Niemniej jednak niemożliwe jest osiągnięcie takich warunków przy zastosowaniu ropy naftowej, przez co wyniki otrzymane w powyższym eksperymencie są istotne dla przyszłego zastosowania BES w procesie bioremediacji.

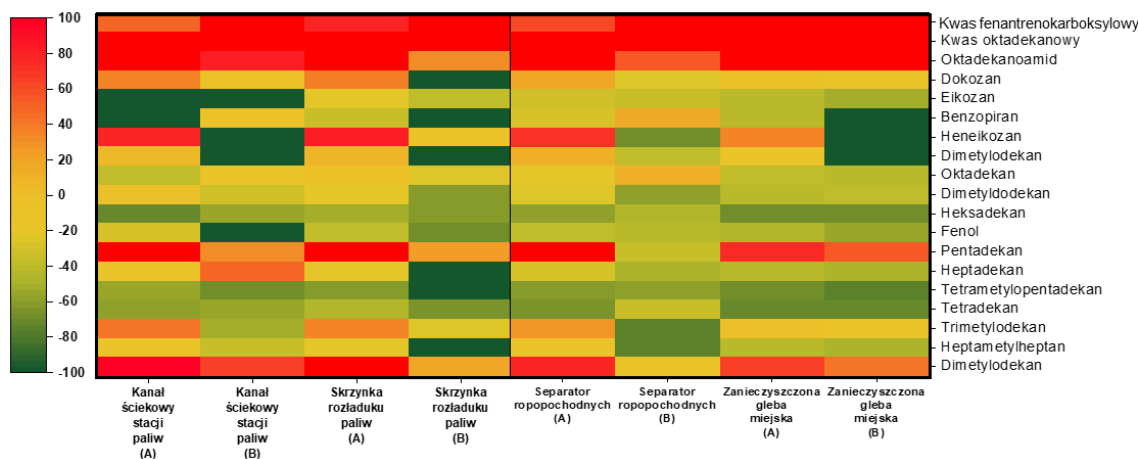
Konsorcja Sri Lanki, gleby kanału ściekowego stacji paliw i separatora ropopochodnych wykazały największą zdolność do adaptacji w serii A. Osiągały przy tym niskie opory wewnętrzne w końcowych tygodniach eksperymentu, co mogło wskazywać na ich potencjał w długoterminowych okresach eksperymentalnych. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy podkreślają znaczenie optymalizacji mikrobiologicznych ogniw paliwowych, zwłaszcza poprzez odpowiedni dobór substratów. Obniżenie oporów wewnętrznych przy zastosowaniu właściwych związków chemicznych poprawia warunki elektrochemiczne, co zwiększa produkcję energii. Kluczowym czynnikiem wpływającym na wydajność jest opór anody, którego wzrost może wskazywać na problemy z aktywnością mikroorganizmów i odkładanie się zanieczyszczeń na elektrodzie. W przypadku trudnych do degradacji substratów ważne jest zapewnienie odpowiednich warunków, np. zwiększając dostępność substratów dla mikroorganizmów przy pomocy biosurfaktantów. Zdolność mikroorganizmów do adaptacji nie zawsze jest wystarczająca w dłuższym okresie. Wzrost oporów wewnętrznych z czasem obniża wydajność ogniw, co było widoczne w powyższym eksperymencie. Dlatego konieczny jest dobór substratów sprzyjających stabilności w długoterminowych eksperymentach. Konsorcja mikroorganizmów o wysokim potencjale adaptacyjnym mogą być cennym elementem w przyszłych badaniach, szczególnie w kontekście bioremediacji.

7.3.4 Analiza degradacji związków ropopochodnych przez układy bioelektrochemiczne

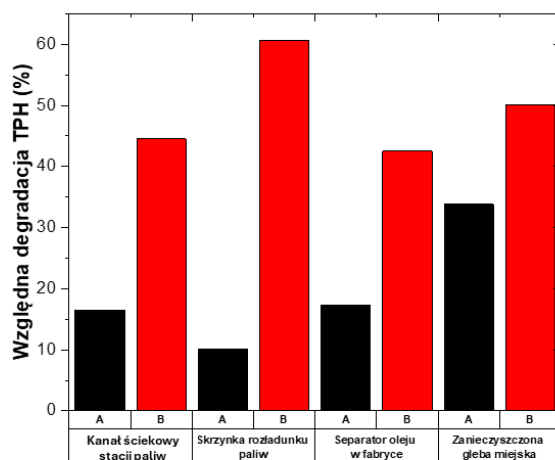
Na mapach cieplnych przedstawiono względną degradację związków ropopochodnych dla dwóch serii eksperymentalnych: seria A (ropa naftowa + octan sodu) oraz seria B (tylko ropa naftowa). Analiza została przeprowadzona dla anolitów uzyskanych w siódmym tygodniu eksperymentu.

Antropogeniczne środowiska glebowe

A



B



Rysunek 39 Analiza degradacji związków ropopochodnych w anolitach antropogenicznych środowisk glebowych. **A** – Zmiana względnej powierzchni sygnałów wykrytych związków węglowodorowych dla serii A i B. **B** – Względna degradacja węglowodorów ropopochodnych (TPH). Wykres przedstawia wyniki dla antropogenicznych środowisk glebowych.

Analiza otrzymanych wyników dla konsorcjum kanału ściekowego stacji paliw wykazała degradację dużej ilości związków ropopochodnych (rysunek 39A). Obie serie charakteryzowały się redukcją wielu z wykrytych związków takich jak: eikozan, benzopiran, heneikozan, dimetyldodekan, heksadekan, fenol, tetradekan. W obu seriach wykryto dodatkowo przyrost stężenia takich związków jak: kwas fenantrenokarboksylowy, kwas oktadekanowy, oktadekanoamid oraz dimetyldodekan.

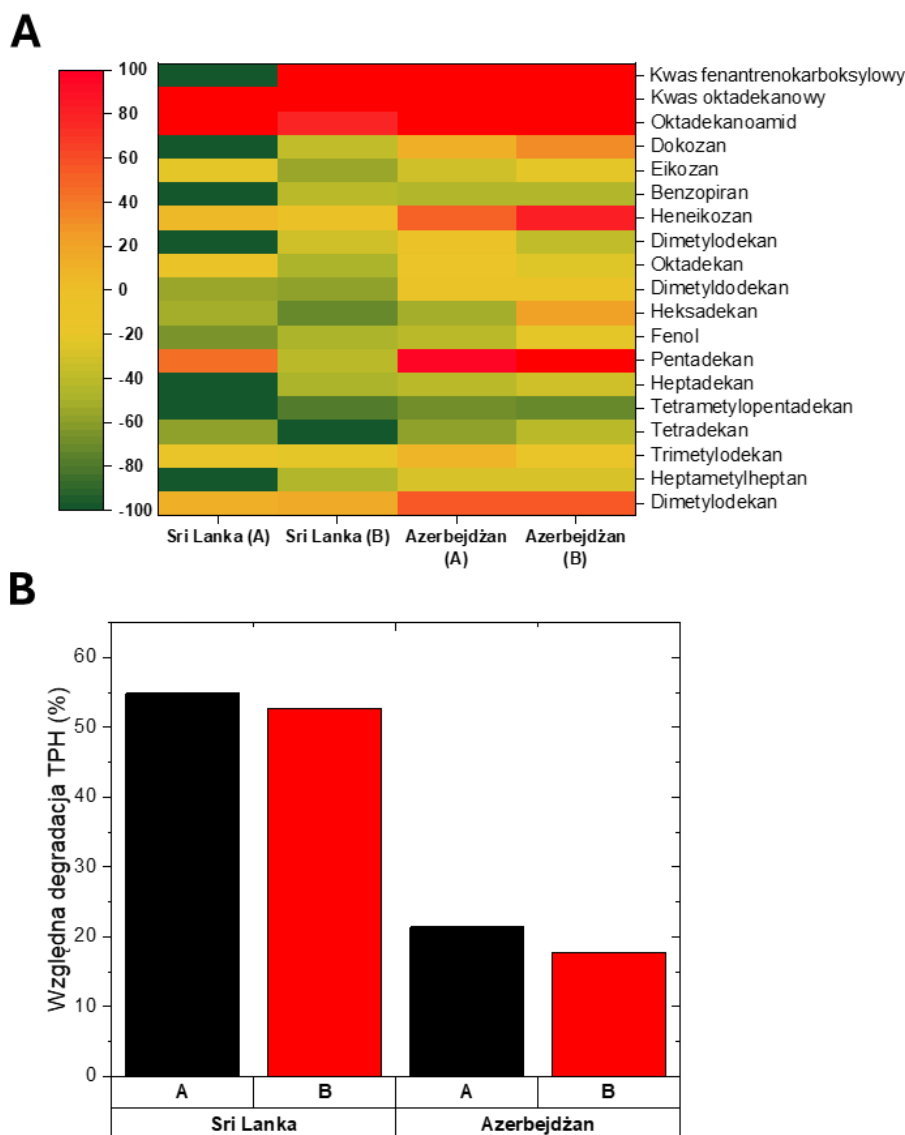
Analiza degradacji TPH wykazała, że dodatek octanu sodu miał negatywny wpływ na degradację związków ropopochodnych przez to konsorcjum (rysunek 39B). Seria B posiadała względną degradację TPH równą 44,49 %, co było wartością 2,70 razy wyższą niż ta uzyskana dla serii A (16,48 %).

Wyniki uzyskane dla konsorcjum skrzynki rozładunku paliw różniły się pomiędzy poszczególnymi seriami. Analiza mapy cieplnej (rysunek 39A) wykazała, że seria B charakteryzowała się większym stopniem degradacji ropopochodnych, co potwierdziła redukcja takich związków jak: dokozan, eikozan, benzopiran, dimetylodekan, heksadekan, fenol, heptadekan, tetradekan. W obu seriach wykryto przyrost stężenia takich związków jak: kwas fenantrenokarboksylowy, kwas oktadekanowy, oktadekanoamid. Analiza degradacji TPH potwierdziła wyniki prezentowane na wykresie słupkowym (rysunek 39B). Seria B posiadała względną degradację TPH równą 60,69 %, co było wartością 5,98 razy wyższą niż ta uzyskana dla serii A (10,14 %). Konsorcjum to, dla serii B, osiągnęło najwyższy stopień degradacji TPH w trakcie wykonanych analiz.

Identycznie jak dla poprzednich analiz, konsorcjum separatora ropopochodnych odpowiadało za degradację wielu związków ropopochodnych. Przedstawione na mapie cieplnej wyniki wskazują, że duża część wykrytych związków uległa redukcji oraz, że proces ten był bardziej efektywny dla serii B (rysunek 39A). Potwierdza to redukcja takich związków jak: eikozan, heneikozan, dimetylodekan, heksadekan, fenol, heptadekan, tetradekan. W obu seriach wykryto dodatkowo przyrost stężenia takich związków jak: kwas fenantrenokarboksylowy, kwas oktadekanowy, oktadekanoamid, pentadekan. Wyniki zaprezentowane na rysunku 39B potwierdzają zbliżoną do siebie wydajność degradacji ropopochodnych. Seria B posiadała względną degradację TPH równą 42,49 %, co było wartością 2,45 razy wyższą niż ta uzyskana dla serii A (17,32 %).

Konsorcjum zanieczyszczonej gleby miejskiej charakteryzowało się najbardziej przybliżonymi do siebie wynikami degradacji ropopochodnych pomiędzy seriami (rysunek 39A). Niezależnie od użytego substratu, konsorcjum to przyczyniło się do degradacji niemal wszystkich wykrytych związków w mieszaninie ropy naftowej. W obu seriach wykryto dodatkowo przyrost stężenia takich związków jak: kwas oktadekanowy, kwas oktadekanowy, oktadekanoamid oraz dimetylodekan. Analiza degradacji TPH dodatkowo potwierdziła duży spadek stężeń związków ropopochodnych (rysunek 39B). Seria B posiadała względną degradację TPH równą 50,04 %, co było wartością 1,48 razy wyższą niż ta uzyskana dla serii A (33,78 %).

Gleby azjatyckie



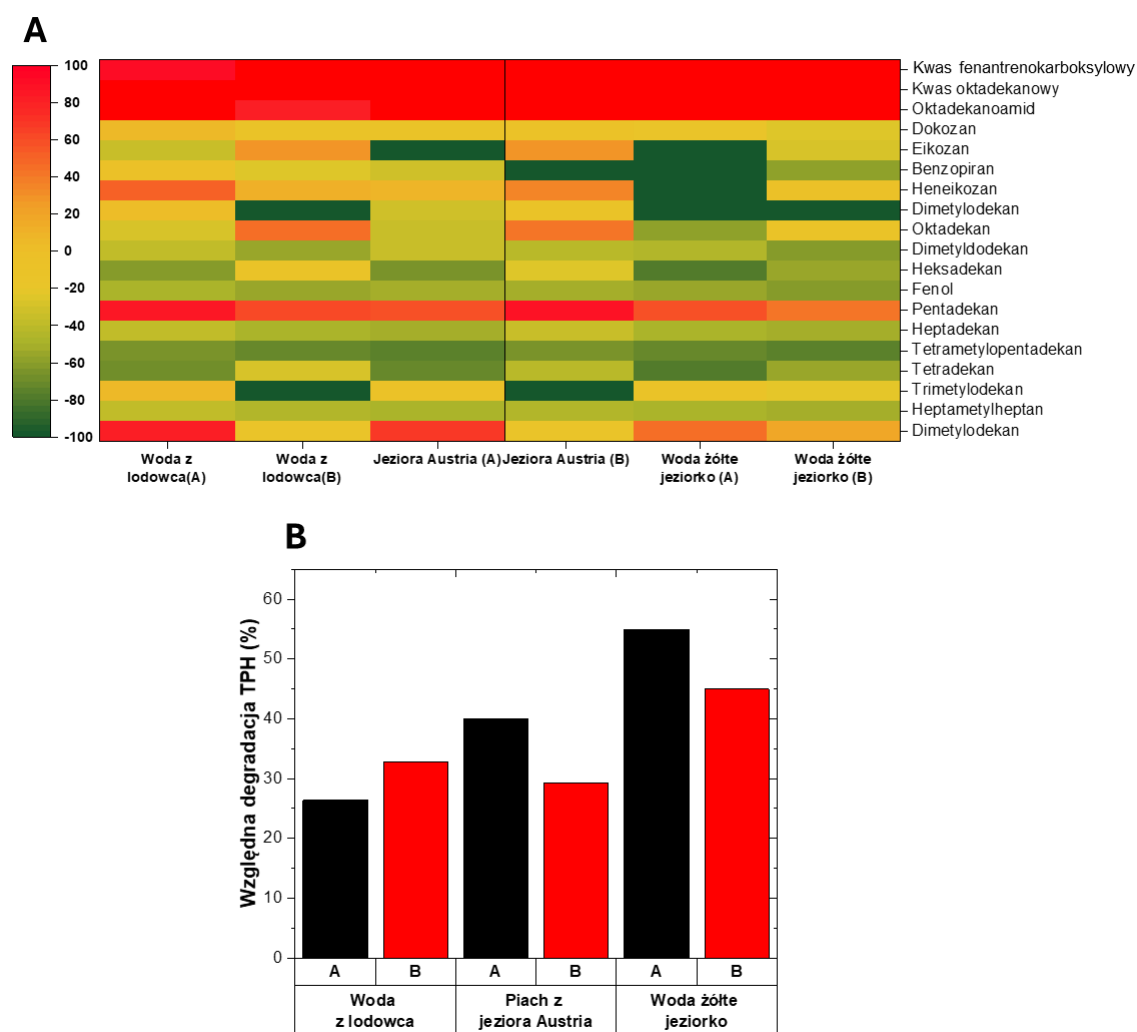
Rysunek 40 Analiza degradacji związków ropopochodnych w anolitech konsorcjów gleb azjatyckich. **A** – Zmiana względnej powierzchni sygnałów wykrytych związków węglowodorowych dla serii A i B. **B** – Względna degradacji węglowodorów ropopochodnych (TPH).

Degradacja związków ropopochodnych w ogniowach wykorzystujących konsorcjum gleby Sri Lanki była bardzo wydajna (rysunek 40A). Duża część związków wykrytych w trakcie analiz została zdegradowana zupełnie lub w dużym stopniu niezależnie od użytego substratu. Konsorcjum to odpowiadało za degradację takich związków jak: dokozaan, eikozan, benzopiran, heneikozan, dimetyloodekan, heksadekan, fenol, heptadekan, tetradekan oraz kwas fenantrenokarboksylowy (seria A). W ogniowach zaobserwowano również akumulację związków takich jak: kwas fenantrenokarboksylowy (seria B), kwas oktadekanowy, oktadekanoamid oraz pentadekan (seria A). Analiza degradacji TPH wykazała również minimalną różnicę pomiędzy stopniem degradacji ropopochodnych (rysunek 40B). Seria A posiadała

względną degradację TPH na poziomie 54,89 %, co było wartością 1,04 razy wyższą niż ta uzyskana dla serii B (52,70 %).

Analiza degradacji związków ropopochodnych dla obu serii konsorcjum Azerbejdżanu wykazała niską wydajność procesu (rysunek 40A). Niemniej jednak konsorcjum to degradowało takie związki jak: eikozan, benzopiran, dimetyldodekan, fenol, heptadekan, tetradekan. W próbkach wykryto podwyższone stężenie takich związków jak: kwas fenantrenokarboksylowy, kwas oktadekanowy, oktadekanoamid, heneikozan oraz pentadekan. Analiza degradacji TPH wykazała niską różnicę pomiędzy stopniem degradacji ropopochodnych (rysunek 40B). Seria A posiadała względną degradację TPH na poziomie 21,39 %, co było wartością 1,21 razy wyższą niż ta uzyskana dla serii B (17,75 %).

Środowiska wodne



Rysunek 41 Analiza degradacji związków ropopochodnych w anolitach konsorcjów środowisk wodnych. **A** – Względna zmiana powierzchni sygnałów wykrytych związków węglowodorowych dla serii A i B. **B** – Względna degradacja węglowodorów ropopochodnych (TPH). Wykres przedstawia wyniki dla środowisk cieków wodnych.

Analizowane konsorcjum wody z lodowca (rysunek 41A) odpowiadało za degradację dużej części wykrytych związków ropopochodnych, niezależnie od użytego substratu. Analiza obu próbek wykazała redukcję stężeń takich związków jak: benzopiren, dimetylodekan, dimetylododekan, fenol, heptadekan. W anolicie wykryto wzrost stężeń następujących związków chemicznych: kwas fenantrenokarboksylowy, kwas oktadekanowy, oktadekanoamid, heneikozan, oktadekan (seria B) oraz pentadekan. Analiza wykazała dodatkowo, że degradacja w ogniwie serii B przebiegała wydajniej. Seria B posiadała względną degradację TPH na poziomie 32,84 %, co było wartością 1,24 razy wyższą niż ta uzyskana dla serii A (26,40 %) (rysunek 41B).

Dane z analizy konsorcjum jeziora Austrii przedstawione na wykresie (rysunek 41A) wskazują na duży stopień degradacji ropopochodnych przez to konsorcjum, szczególnie dla próbek serii A. Szczegółowa analiza degradowanych związków wykazała redukcję takich związków jak: eikozan (seria A), benzopiren, dimetylodekan, oktadekan, dimetylododekan, heksadekan, fenol, heptadekan. Dodatkowo ponownie zaobserwowano akumulację: kwasu fenantrenowo-karboksylowego, kwasu oktadekanowego oktadekanoamidu, eikozanu (seria B), henoikozanu (seria B), oktadekanu (seria B), pentadekanu oraz dimetylododekanu. Seria A posiadała względną degradację TPH na poziomie 39,95 %, co było wartością 1,36 razy wyższą niż ta uzyskana dla serii B (29,29 %) (rysunek 41B).

Dane o degradacji związków ropopochodnych przez konsorcjum wody z żółtego jeziora zaprezentowano na mapie cieplnej (rysunek 41A). Przedstawiono na niej degradację niemal wszystkich wykrytych związków w mieszaninie anolitu. Dodatkowo, tak jak w poprzednich próbkach, wykryto akumulację kwasu fenantrenokarboksylowego, kwasu oktadekanowego, oktadekanoamidu, pentadekanu w roztworze anolitu. Konsorcjum wody z żółtego jeziora charakteryzowało się najwyższym stopniem degradacji TPH dla tej grupy konsorcjów (rysunek 41B). Seria A posiadała względną degradację TPH na poziomie 54,97 %, co było wartością 1,22 razy wyższą niż ta uzyskana dla serii B (44,95 %).

Podsumowanie

W powyższym eksperymencie analizowano skuteczność degradacji związków ropopochodnych w MFC przez konsorcja mikrobiologiczne pochodzące z różnych środowisk. Badania miały na celu ocenę, które związki ropopochodne były degradowane oraz jaka była ogólna wydajność degradacji tych związków w mieszaninie anolitu. Konsorcja były testowane w dwóch seriach: seria A – zasilane ropą naftową i octanem sodu oraz seria B – zasilane wyłącznie ropą naftową.

Badania wykazały dużą wydajność w degradacji przez konsorcja mikrobiologiczne takich związków jak: eikozan, benzopiren, dimetylodekan, heksadekan, fenol, tetradekan. Świadczy to o występujących w środowisku naturalnym mikroorganizmach degradujących związki ropopochodne. Badania pozwoliły również określić, które konsorcja najefektywniej degradują związki ropopochodne. Konsorcjum skrzynki rozładunku paliw (seria B) wykazało najwyższą degradację TPH na poziomie 60,69 %. Degradacja TPH dla konsorcjum gleby Sri Lanki osiągnęła wydajność 54,89 %, co było

najlepszym wynikiem dla gleb azjatyckich. Dodatkowo konsorcjum wody z żółtego jeziorka dla serii A osiągnęło degradację TPH na poziomie 54,97 %. Wysoki wynik degradacji konsorcjum środowiska wodnego nie wiąże się jednak z wydajnością produkcji prądu elektrycznego. Pozwala to stwierdzić, że degradacja węglowodorów przez to konsorcjum zachodziła poprzez alternatywne procesy biologiczne, które nie generowały ładunku elektrycznego. Obecność octanu sodu negatywnie wpływała na degradację związków ropopochodnych, obniżając efektywność procesu w większości konsorcjów. Najbardziej widoczne było to w przypadku konsorcjów antropogenicznych, gdzie seria B osiągnęła wyższy stopień degradacji. W badaniu M.P. Tomasina i in. wykazano, że wyizolowane konsorcja kondycjonowane w roztworze octanu sodu lub ropy naftowej charakteryzowały się lepszą degradacją związków ropopochodnych w porównaniu do konsorcjów naturalnych [256]. U X. Liua i in. wykorzystanie dodatku prostych substratów takich jak glukoza, metanol, octan sodu i bursztynian sodu przy degradacji związków ropopochodnych wykazało degradację tych związków na poziomie 76,7 %. Wynik ten uzyskano jednak dopiero po zastosowaniu biosurfaktantu lipopeptydowego [257].

We wszystkich konsorcjach zaobserwowano akumulację związków takich jak kwas fenantrenowo-karboksylowy, kwas oktadekanowy, oktadekanoamid, dimetyloheksan. W artykule G. Palanisamy i in. stwierdzono, że efektywność biodegradacji oraz generowanie prądu elektrycznego zależą od biodostępności substratu, szybkości transportu masy oraz metabolizmu mikroorganizmów. W zależności od stężenia związków ropopochodnych w MFC, możliwe jest osiągnięcie efektywnej degradacji zanieczyszczeń lub akumulacja frakcji związków aromatycznych, asfaltenów i innych substancji o wysokiej masie cząsteczkowej [152]. W badaniu P. Dessia i in. opisano proces powstawania kwasów karboksylowych w wyniku biotransformacji dwutlenku węgla przez mikroorganizmy w układzie bioelektrochemicznym. Produkt ostateczny był uzależniony od stężenia dwutlenku węgla w anodzie [258]. W badaniu K. Chandrasekhara i S. V. Mohan zastosowano BES do remediacji ścieków rafineryjnych bogatych w WWA. Duże stężenie związków ropopochodnych skutkowało akumulacją związków o budowie 2- i 3-pierścieniowej, przy jednoczesnej degradacji związków o liczbie pierścieni większej niż 4. Zwiększone stężenie związków o niższej liczbie pierścieni obserwowane po obróbce mogło być spowodowane biotransformacją związków aromatycznych o wyższej masie cząsteczkowej w wyniku wywołanego biopotencjału prowadzącego do aktywności bioelektrokatalitycznej w BES [259]. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że stężenie ropy naftowej zastosowane w eksperymencie było zbyt wysokie, co prowadziło do akumulacji związków ropopochodnych. Dodatkowo, wyniki pomiarów elektrochemicznych wskazują, że dodatek kosubstratu pozytywnie wpływał na adaptację konsorcjów mikroorganizmów w układach bioelektrochemicznych. Dobrze rozwinięty biofilm nie tylko zwiększa produkcję energii elektrycznej, ale także umożliwia dłuższą i stabilniejszą pracę systemu. Choć konsorcja w Serii B wykazały wyższy stopień degradacji związków ropopochodnych, to po 7. tygodniu zaobserwowano spowolnienie ich rozwoju. Jest to

zjawisko niekorzystne w kontekście przyszłych badań nad wykorzystaniem układów bioelektrochemicznych do bioremediacji.

7.3.5 Podsumowanie i wnioski

Celem powyższego eksperymentu było określenie wydajności konsorcjów mikrobiologicznych w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych pod względem produkcji prądu oraz zdolności do degradacji związków ropopochodnych. Ponadto, eksperyment miał na celu identyfikację konsorcjów bogatych w mikroorganizmy zdolne do produkcji biosurfaktantów. Konsorcja serii A (octan sodu z ropą naftową) charakteryzowały się wyższą produkcją prądu elektrycznego i niższymi oporami wewnętrznymi w porównaniu do serii B (ropa naftowa). Octan sodu wpływał pozytywnie na wzrost biofilmu, co przekładało się na lepszą adaptację układu do produkcji prądu elektrycznego. Efektywność tego procesu przełożyła się na wysokie wartości gęstości mocy konsorcjów Sri Lanki ($356,84 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) oraz separatora ropopochodnych ($252,08 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$). Choć dla serii B wartości gęstości mocy były niższe, niektóre konsorcja (np. woda z żółtego jeziora, kanał ściekowy stacji paliw) wykazały tendencję wzrostową w produkcji prądu elektrycznego w późniejszym okresie eksperymentu (14. tydzień), co mogło wskazywać na ich zdolność do adaptacji do trudniejszych warunków po dłuższym okresie inkubacji. Dodatek octanu sodu dodatnio wpłynął na aktywność elektrochemiczną konsorcjów, co skutkowało wyższą produkcją prądu oraz większą liczbą wykrytych układów redoks. Konsorcja serii A charakteryzowały się niższymi oporami wewnętrznymi, co przekładało się na lepsze warunki elektrochemiczne i wyższą wydajność procesów redoks w dłuższym okresie. Chociaż konsorcja serii B wykazały zdolność do adaptacji do trudniejszych warunków procesu, to w dłuższym czasie efektywność tych konsorcjów spadała, co ograniczało ich wydajność w procesie produkcji prądu elektrycznego. Zostało to potwierdzone przez wysokie wartości oporów wewnętrznych. Badania degradacji związków ropopochodnych wykazały, że dla serii B konsorcja miały wyższą skuteczność w degradacji związków ropopochodnych, szczególnie dla antropogenicznych środowisk glebowych. Na przykład, konsorcjum skrzynki rozładunku paliw osiągnęło najwyższą degradację TPH w eksperymencie na poziomie 60,69 %, podczas gdy wyższa produkcja energii elektrycznej dla serii A nie wiązała się ze znacznie podwyższonymi wartościami degradacji TPH.

Na podstawie wyżej przedstawionych wyników wybrano trzy konsorcja mikrobiologiczne o najwyższej wydajności. Były to: konsorcjum skrzynki rozładunku stacji paliw, konsorcjum separatora ropopochodnych oraz gleby Sri Lanka. Konsorcja te charakteryzowały się wysoką wydajnością produkcji prądu elektrycznego i degradacji ropopochodnych. Dodatkowo na podstawie badań woltamperometrii cyklicznej określono formalne potencjały układów redoks charakterystycznych dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa*, co wskazuje na obecność potencjalnych producentów biosurfaktantów w tych konsorcjach. Obecność potencjalnych producentów biosurfaktantów w zastosowanym konsorcjum mikrobiologicznym odgrywa istotną rolę w zwiększeniu efektywności procesu degradacji związków ropopochodnych. Ponadto,

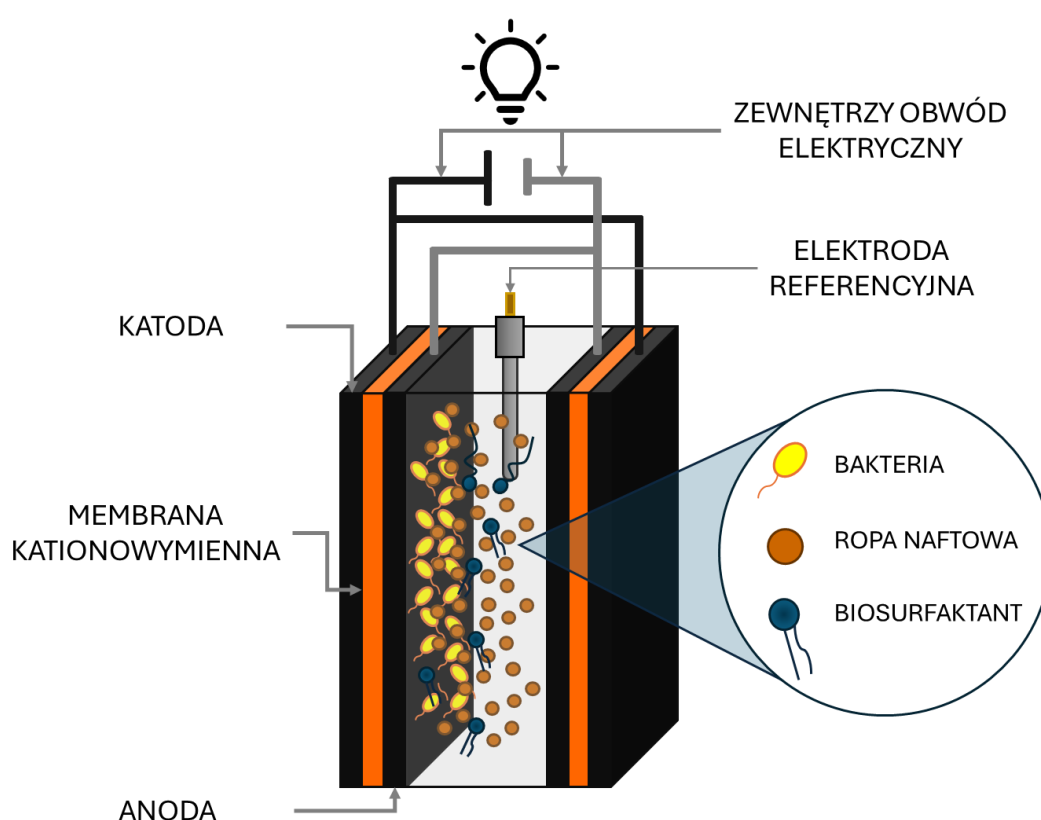
kluczowym czynnikiem wpływającym na funkcjonowanie układów bioelektrochemicznych jest zdolność tych konsorcjów do adaptacji do warunków procesu generowania prądu z zanieczyszczeń ropopochodnych. Im szybciej dane konsorcjum będzie w stanie wytwarzać prąd o wysokiej gęstości mocy, tym większa będzie skuteczność degradacji zanieczyszczeń ropopochodnych.

W niniejszym eksperymencie wykazano, że konsorcja mikrobiologiczne pozyskane bezpośrednio ze środowiska mogą charakteryzować się zarówno zdolnością do wytwarzania prądu o wysokich wartościach gęstości mocy, jak i wysoką skutecznością w degradacji związków ropopochodnych. Takie właściwości wskazują na ich potencjał w przyszłych zastosowaniach biotechnologicznych, zwłaszcza w kontekście bioremediacji środowisk zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi.

7.4 Intensyfikacja produkcji związków powierzchniowo czynnych w układach bioelektrochemicznych

7.4.1 Opis przeprowadzonego doświadczenia

W poniższym eksperymencie trzy elektroaktywne konsorcja mikrobiologiczne zdolne do degradacji związków ropopochodnych zostały przebadane pod kątem produkcji prądu i związków powierzchniowo czynnych. Wybrano trzy konsorcja użyte podczas poprzedniego eksperymentu, które charakteryzowały się produkcją prądu elektrycznego o wysokich gęstościach mocy oraz wysokim stopniem degradacji związków ropopochodnych. Badanymi konsorcjami były próbki pochodzące z kanału ściekowego stacji paliw, separatora ropopochodnych oraz ze Sri Lanki.



Rysunek 42 Schemat konfiguracji mikrobiologicznego ogniwa paliwowego użytego w eksperymencie.

Układy bioelektrochemiczne w postaci mikrobiologicznych ogniw paliwowych użytych w eksperymencie zostały zaprojektowane przy pomocy oprogramowania Inventor (Autodesk), a elementy ich budowy wycięto laserem w arkuszach szkła akrylowego (PMMA) (rysunek 42). Zaprojektowane do badań ogniwa charakteryzowały się jedną komorą anodową oraz dwoma katodami powietrznymi (układ jednokomorowy). Anody i katody zostały połączone ze sobą równolegle. Objętość robocza ogniw równa była 100 cm^3 . Prostokątne anody o łącznej powierzchni geometrycznej 60 cm^2 zostały przygotowane z welonu węglowego (PRF Composite Materials, Dorset, UK) z drutem stalowym 308LSi. Katoda została wykonana z węgla aktywnego CWZ-22 ($850\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)

z siatką ze stali nierdzewnej jako kolektorem prądu. Powierzchnia katody była równa powierzchni anody. Jako separator pomiędzy anodą i katodą zastosowano membranę kationowymienną (CMI-7000, USA). Na początku eksperymentu ustawiono początkową rezystancję zewnętrzną (R_{zew}) równą 2 k Ω . Po każdym pomiarze woltamperometrii liniowej obliczona została optymalna rezystancja w punkcie maksymalnej gęstości mocy, którą dostosowywano na rezystorze zewnętrznym (minimalnie 0,1 k Ω , maksymalnie 10 k Ω). Wszystkie pomiary w tym eksperymencie zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej 25°C.

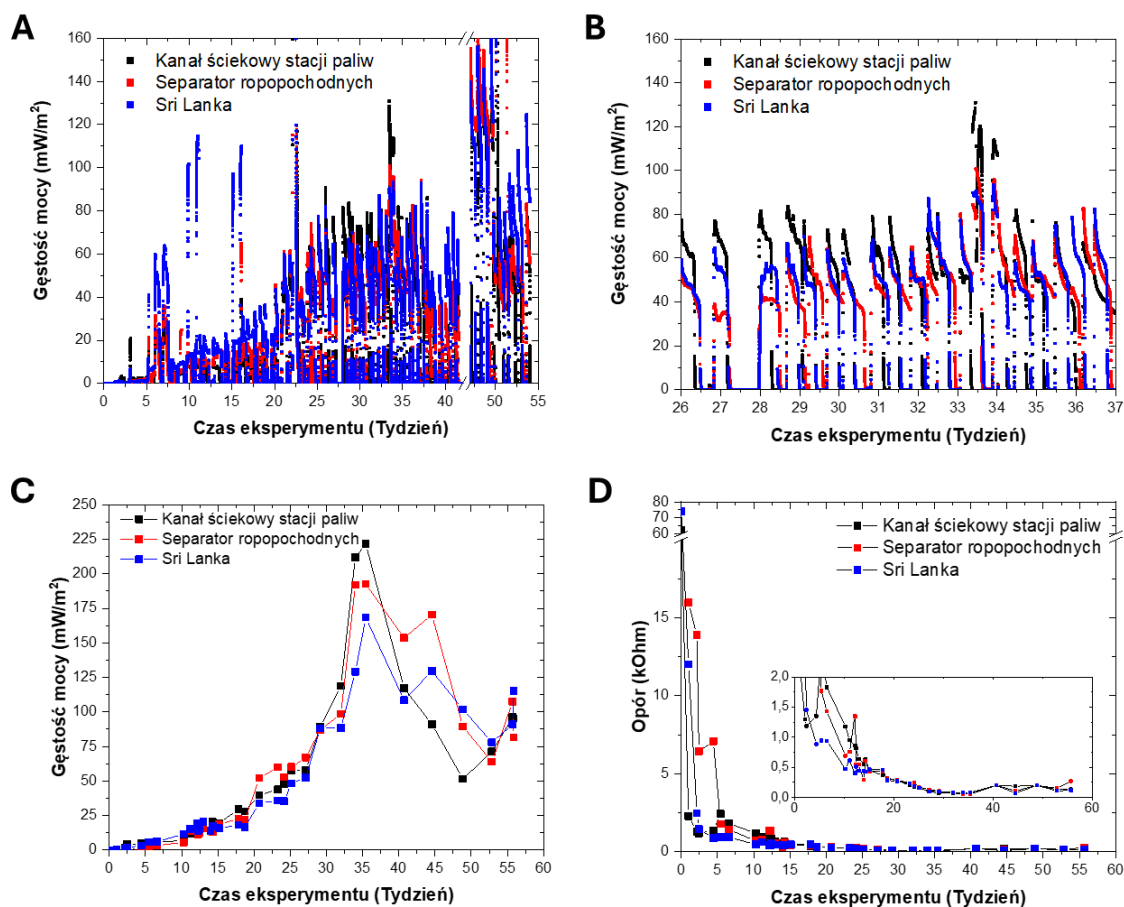
Inokulacja ogniw została przeprowadzona przy użyciu roztworu mikroorganizmów rozwiniętych we wcześniej działających układach bioelektrochemicznych. Użyta zawiesina posiadała gęstość równą 0,6 w standardowej skali McFarlanda. Skład MSM oparty został na zmodyfikowanej formule opisanej w publikacji G. Pasternaka i B. Kołwzan [185] o zmniejszonej zawartości azotu w celu intensyfikacji produkcji biosurfaktantów zgodnie z badaniami A. de Rosset i in. [260]. Skład MSM w porównaniu do eksperymentu opisanego w rozdziale 7.3 niniejszej pracy różnił się jedynie stężeniem NH_4Cl (Chempur, Polska), które zostało zmniejszone do 0,5 g·L⁻¹. Stężenie źródła węgla nie uległo zmianie. Skład zastosowanej ropy naftowej został opisany w poprzednim eksperymencie (rozdział 7.3).

Poza procesem wymiany pożywki na nową oraz przeprowadzanymi pomiarami elektrochemicznymi, ogniwa podłączono do systemu akwizycji danych DAQ970A (Keysight). Eksperyment monitorowany był w czasie rzeczywistym z trzy minutowym interwałem próbkowania.

7.4.2 Analiza produkcji prądu elektrycznego w trakcie eksperymentu

Podczas dziewięciu miesięcy pracy mikrobiologicznych ogniw paliwowych mierzona była produkcja prądu elektrycznego w czasie rzeczywistym. Rysunek 43A przedstawia dane dla najbardziej wydajnego MFC (z duplikatów) dla każdego z wykorzystanych w doświadczeniu konsorcjów. Według zarejestrowanych pomiarów, żadne MFC nie charakteryzowało się wysoką produkcją prądu elektrycznego w ciągu pierwszych pięciu tygodni pracy. W tym czasie rozwijał się biofilm bogaty w bakterie zdolne do metabolizowania trudnych w degradacji związków ropopochodnych. Jak zauważono w pracy G. Pasternaka i in. w początkowej fazie eksploatacji wzrost biofilmu jest procesem ograniczającym wydajność MFC, co skutkuje otrzymywaniem niskich wartości gęstości mocy [242]. Od 6. do 26. tygodnia zaobserwowano intensywny wzrost wartości gęstości mocy, który zakończył się fazą stacjonarną na 11 tygodni (rysunek 43B). W trakcie tego okresu średnia maksymalna gęstość mocy zarejestrowana dla ogniw wynosiła $79,72 \pm 15,97$ mW·m⁻² (kanał ściekowy stacji paliw), $69,19 \pm 14,60$ mW·m⁻² (separator ropopochodnych) oraz $70,97 \pm 11,33$ mW·m⁻² (Sri Lanka). W 33. tygodniu (237 dzień po inokulacji) maksymalna wartość gęstości mocy została zaobserwowana dla kanału ściekowego stacji paliw i była równa 130,99 mW·m⁻². Analogicznie w trakcie tego

samemu cyklu zasilania zaobserwowano wartości niższe o 22,92 % i 28,45 % odpowiednio dla separatora ropopochodnych oraz Sri Lanki.



Rysunek 43 **A** – Wartości gęstości mocy zaobserwowane w czasie eksperymentu. **B** – Gęstość mocy w czasie fazy stacjonarnej (między 26. a 37. tygodniem eksperymentu) **C** – Wykres gęstości mocy w trakcie eksperymentu, wartości średnie dla duplikatów wyliczone z pomiarów voltamperometrii liniowej. **D** – Opór wewnętrzny ogniwa w trakcie trwania eksperymentu

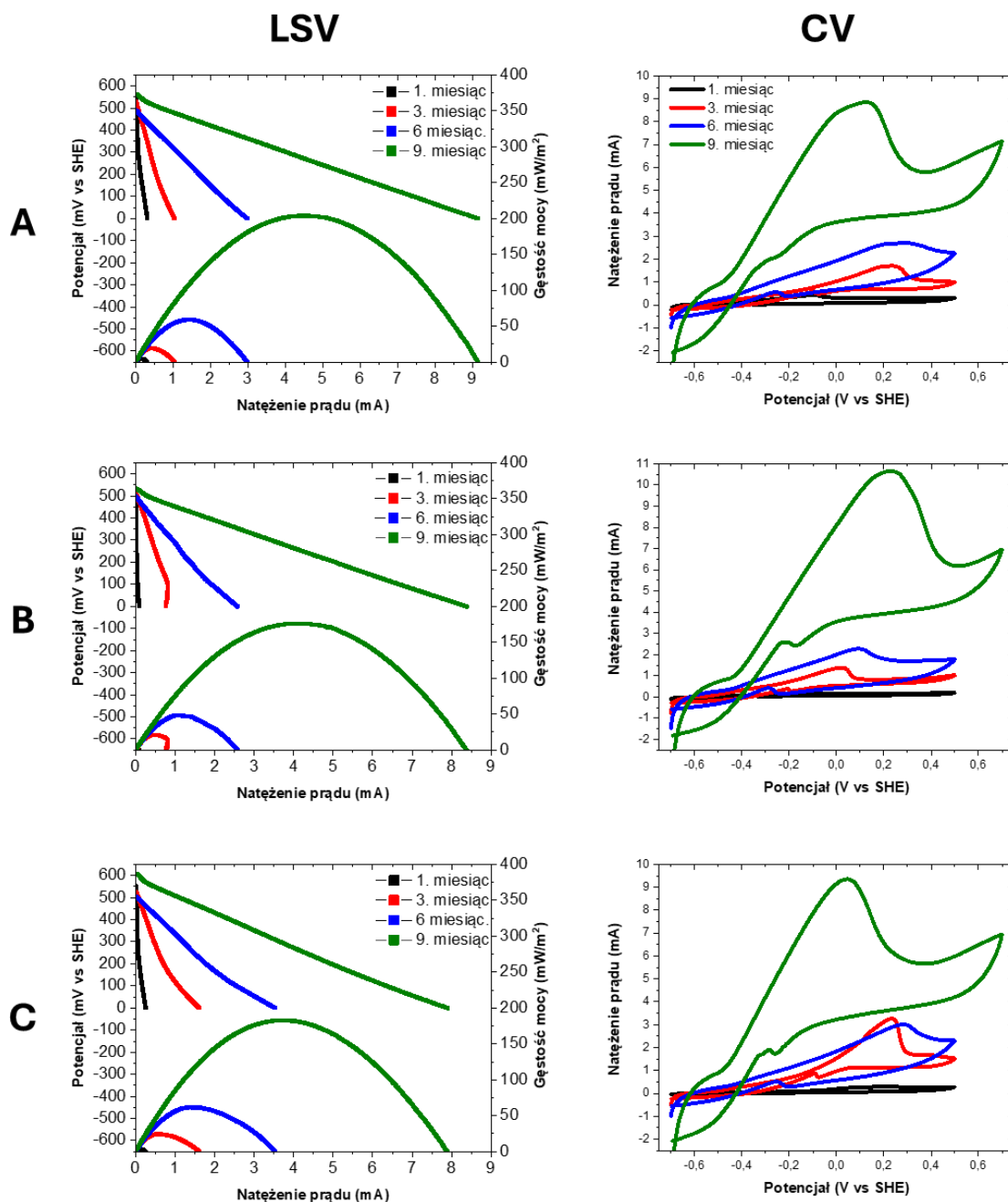
Rysunek 43C przedstawia maksymalne wartości gęstości mocy. Na rysunku 43B przedstawiono zmianę oporu wewnętrznego w ogniwach. Punkty przedstawione na wykresie reprezentują wartości średnie dla duplikatów. Wykres ten zawiera również informację o najwyższej średniej gęstości mocy osiągniętej w trakcie całego eksperymentu, która była równa $221,68 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ dla konsorcjum kanału ściekowego stacji paliw. W tym samym okresie zaobserwowano maksymalną gęstość mocy równą $192,69 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ oraz $168,47 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ odpowiednio dla konsorcjów: separatora ropopochodnych oraz Sri Lanki. Były to wartości o 13,08 % i 24,01 % niższe niż te uzyskane dla kanału ściekowego stacji paliw. Do 35. tygodnia eksperymentu widoczny był wzrost wartości gęstości mocy dla każdego z ogniw, zakończony maksymalnymi wartościami osiągniętymi w eksperymencie. Po 35. tygodniu eksperymentu obserwowany był spadek produkowanego prądu elektrycznego dla każdego z ogniw. Zgodnie z opisem w artykule G. Pasternak i in., w trakcie długiego czasu eksploatacji mikrobiologicznych ogniw paliwowych ich wydajność znacząco spada przez zjawisko

biofoulingu [126]. W związku z tym akumulacja martwych komórek bakterii oraz toksycznych substancji (np. związków ropopochodnych) mogła negatywnie wpłynąć na wydajność ogniwa. Ponadto katoda po tak długim czasie eksploatacji również mogła ulec uszkodzeniu, degradacji czy procesowi krystalizacji soli mineralnych pochodzących z MSM. W 53. tygodniu eksperymentu, gdy katody pokryte zostały białym nalotem soli, dokonano procedury ich regeneracji zgodnie z tą opisaną przez G. Pasternaka i in. [261]. Proces ten pozwolił odzyskać część sprawności ogniwa. Gęstość mocy wzrosła odpowiednio o 33,63 % (kanał ściekowy stacji paliw), 68,48 % (separator ropopochodnych), 47,51 % (Sri Lanka) względem poprzedniego pomiaru woltamperometrii.

7.4.3 Analiza pomiarów elektrochemicznych

Woltamperometria liniowa

Na rysunku 44 przedstawiono krzywe polaryzacji i krzywe gęstości mocy z eksperymentów woltamperometrycznych przeprowadzonych w 1., 3., 6., i 9. miesiącu pracy ogniwa. Napięcie obwodu otwartego (OCV) wahało się od 490 mV do 608 mV dla wszystkich MFC. Najwyższą wartość OCV uzyskano dla konsorcjum Sri Lanki w 9. miesiącu eksperymentu (608 mV). Zgodnie z twierdzeniem zaproponowanym przez B. E. Logana i in. może to świadczyć o w pełni rozwiniętym biofilmie anodowym oraz prawidłowym transferze jonów [262]. Dla każdego z ogniwa kształt krzywej polaryzacji był regularny, co świadczy o prawidłowym rozwoju biofilmu oraz optymalnych warunkach pracy ogniwa. Odstępstwem od tego trendu był pomiar w 3. miesiącu dla konsorcjum separatora ropopochodnych. W końcowej fazie polaryzacji zaobserwowano zjawisko przeregulowania, które występowało w obszarze strat transportu masy [196].



Rysunek 44 Wykresy woltamperometrii liniowej i cyklicznej dla ogni w 1., 3., 6. i 9. miesiącu eksperymentu. Litery odpowiadają odpowiednim konsorcjom użytym do zaszczepienia ogni, gdzie **A** – kanał ściekowy stacja paliw, **B** – separator ropopochodnych, **C** – Sri Lanka.

Wyodrębnione krzywe mocy pozwoliły na obserwację dynamiki rozwoju każdego z konsorcjów mikrobiologicznych. Konsorcjum kanału ściekowego stacji paliw charakteryzowało się nie tylko najwyższą gęstością mocy w trakcie pomiarów elektrochemicznych, ale również najwyższymi natężeniami prądu, równymi odpowiednio: $4,55 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (0,32 mA), $19,53 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (1,04 mA), $59,05 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (2,99 mA), $203,97 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (9,15 mA). Drugim konsorcjum mikrobiologicznym reprezentującym najwyższe wartości gęstości prądu oraz jego natężenia była gleba Sri Lanki, która charakteryzowała się następującymi wartościami: $3,26 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (0,25 mA),

24,19 mW·m⁻² (1,61 mA), 61,50 mW·m⁻² (3,54 mA), 182,63 mW·m⁻² (7,90 mA). Trzecim z kolei konsorcjum, które osiągnęło bardzo zbliżone wyniki do pozostałych, był separator ropopochodnych. Wartości otrzymane w trakcie woltamperometrii liniowej dla tego MFC charakteryzowały się niższymi wartościami gęstości mocy (i natężeniami prądu) 1,09 mW·m⁻² (0,09 mA), 20,98 mW·m⁻² (0,82 mA), 48,35 mW·m⁻² (2,58 mA), poza pomiarem w 9. miesiącu, gdzie natężenie prądu w tym ogniwie było wyższe niż dla konsorcjum Sri Lanki i wynosiło 176,20 mW·m⁻² (8,38 mA). Różnice te mogły wynikać zarówno z czasu adaptacji biofilmu do degradacji węglowodorów ropopochodnych, jak i samego składu konsorcjum mikrobiologicznego [263,264]. Warunki wewnętrzne w MFC również odgrywają kluczową rolę w rozwoju elektroaktywnego biofilmu. Zgodnie z wcześniejszym opisem badań bardziej różnorodny biofilm zdolny jest do efektywniejszej degradacji ropopochodnych [244]. Dodatkowo obecność potencjalnych producentów biosurfaktantów może mieć duży wpływ na produkcję prądu, szczególnie podczas wykorzystywania węglowodorów ropopochodnych jako źródła węgla [165,244].

Woltamperometria cykliczna

Analiza woltamperogramów cyklicznych wskazała na występowanie czterech układów redoks biorących udział w transporcie elektronów z biofilmu do anody. Pary układów redoks wystąpiły przy formalnych potencjałach $-0,121 \pm 0,003$ V (1), $-0,072 \pm 0,009$ V (2), $0,030 \pm 0,010$ V (3) oraz $0,087 \pm 0,009$ V (4) względem Ag/AgCl. W tabeli 10 przedstawiono zestawienie przypisanych sygnałów wykrytych na woltamogramach. Podobieństwo w występujących układach redoks we wszystkich ogniwach, na różnym ich etapie rozwoju, wskazuje zarówno na wykorzystanie podobnych szlaków metabolicznych przez mikroorganizmy do degradacji związków ropopochodnych, jak i występowanie na powierzchni anod grup mikroorganizmów o zbliżonej taksonomii. Badania CV przeprowadzono również w czasie plateau produkcji energii elektrycznej, kiedy zarówno pożywka mikrobiologiczna, jak i sam biofilm były nasycone źródłem węgla. Zgodnie z tym niektóre z wykrytych w analizie sygnałów mogły pochodzić od reakcji utleniania redukcji związków organicznych, co znacząco utrudniało analizę sygnałów pojawiających się na woltamogramach.

W badaniu L. Shin i in. opisano, że *Shewanella oneidensis* MR-1 oraz jej cytochromy błony zewnętrznej typu C, takie jak MtrC oraz OmcA mogą być zaangażowane w zewnątrzkomórkowy transfer elektronu w szerokim zakresie potencjałów. Te zewnątrzkomórkowe reduktazy flawin posiadają szeroki zakres potencjału redoks (np. +100 do -500 mV w porównaniu do SHE) [265]. Innym szczepem, którego zakres potencjałów formalnych obejmuje wartości zbliżone do podanych w badaniu jest *Geobacter sulfurreducens*. W artykule K. Joshiego i in. opisano, że szczep ten może wykorzystywać pozakomórkowe akceptory elektronów, takie jak Mn(IV), Fe(III). Mediatory te występują w przedziale od +0,203 do -0,497 V w porównaniu z elektrodą srebrną (Ag/AgCl) [227]. W badaniu opisanym przez E. M. Bosire i M. A. Rosenbaum zastosowano różne potencjały w przedziale od -0,4 do +0,4 V względem Ag/AgCl, aby pobudzić aktywność *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Odkryto, że szczep ten może produkować fenazyny lub wykorzystywać inne mediatory do transportu elektronów

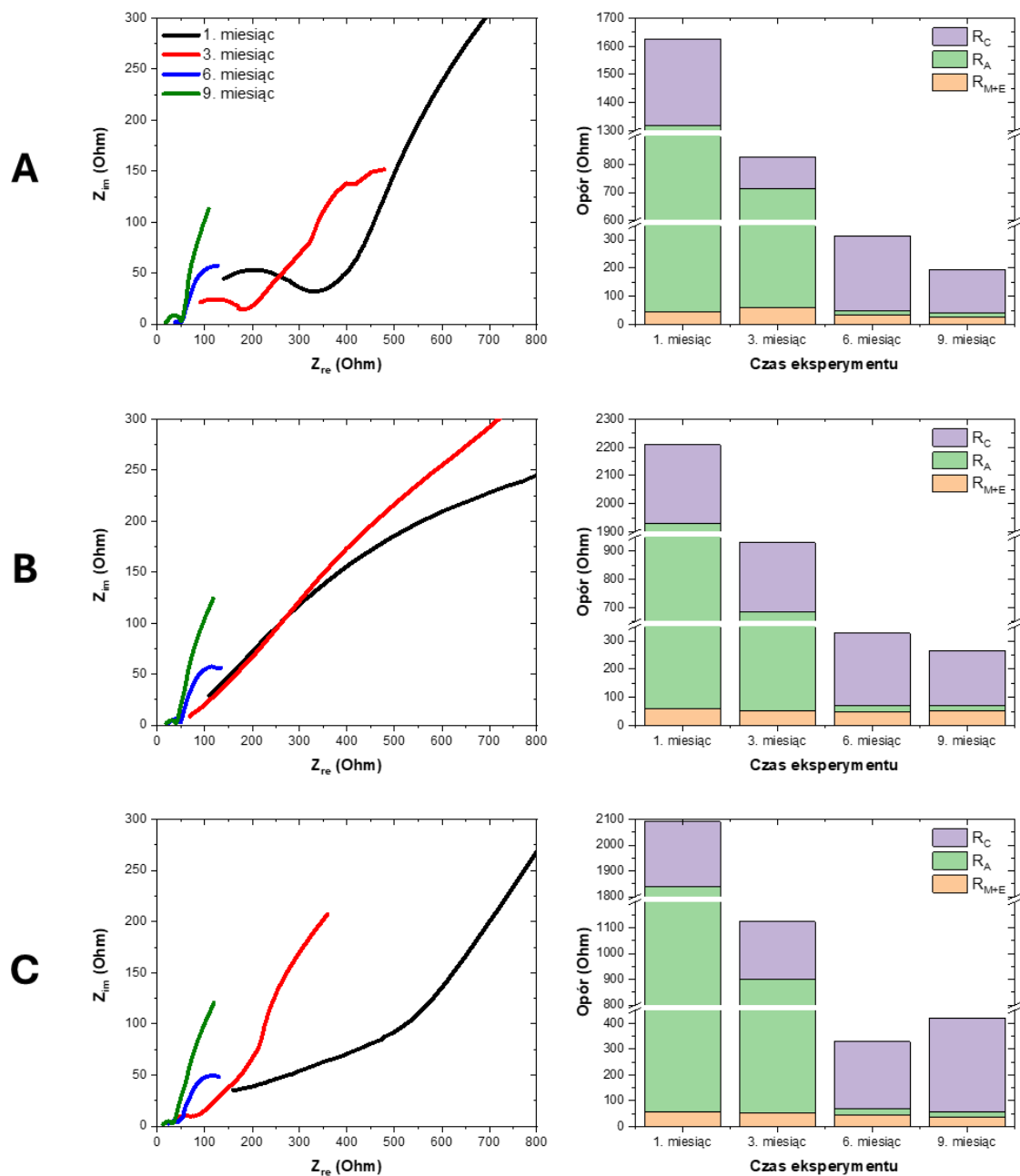
w zakresie od -0,24 V do 0,052 V względem Ag/AgCl [266]. Przedstawione powyżej wyniki badań nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, który szczep oraz jakie mechanizmy odpowiadają za transport elektronów. Konsorcja mikrobiologiczne są złożoną mieszaniną wielu gatunków i szczepów bakterii, których różnorodność pozwala na lepsze przystosowanie się do trudnych warunków środowiskowych. Różne mikroorganizmy mogą wykorzystywać różne systemy transportu elektronów, co dodatkowo utrudnia identyfikację konkretnych mediatorów. Biorąc pod uwagę zastosowany w eksperymencie substrat (ropę naftową), wysokie wartości gęstości prądu oraz charakterystyczne sygnały na woltamogramach, można wywnioskować, że obecne są mikroorganizmy zdolne do produkcji biosurfaktantów.

Tabela 10 Zestawienie sygnałów wykrytych dla poszczególnych woltamogramów.

Rodzaj inokulum	Miesiąc eksperymentu	Wykryty w trakcie analizy sygnał formalny (V względem Ag/AgCl)
Kanał ściekowy stacji paliw	1.	-0,121 ± 0,003
	3.	0,087 ± 0,009
	6.	0,030 ± 0,010
	9.	-0,121 ± 0,003
Separator oleju	1.	0,030 ± 0,010
	3.	-0,072 ± 0,009
	6.	-0,072 ± 0,009
	9.	-0,121 ± 0,003
Sri Lanka	1.	-0,121 ± 0,003
	3.	0,030 ± 0,010
	6.	0,087 ± 0,009
	9.	-0,121 ± 0,003

Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna

Dane eksperymentalne EIS (rysunek 45) dopasowano do modelu obwodu równoważnego zgodnie z publikacją N. Sekara i in.[175]. Element obwodu R_A odpowiadał anodzie, R_C katodzie, a R_{M+E} rezystancjom omowym, wynikającym z zastosowanej membrany oraz elektrolitu. W obwodzie zastosowano element fazy stałej, który odpowiadał pojemnościowemu zachowaniu podwójnej warstwy elektrycznej wynikającej z budowy biofilmu [175]. Dodatkowo na końcu obwodu równoważnego zastosowano element Warburga o skończonej długości [253].



Rysunek 45 Wykresy Nyquista wraz z wykresami słupkowymi przedstawiające rozkład komponentów podczas pomiarów w 1., 3., 6. i 9. miesiącu eksperymentu. Litery odpowiadają konsorcjom użytym do zaszczepienia ogniów, gdzie **A** – kanał ściekowy stacja paliw, **B** – separator ropopochodnych, **C** – Sri Lanka. Na wykresach użyto skrótów oznaczających: R_A – rezystancja anody; R_C – rezystancja katody, R_{M+E} – rezystancja omowa.

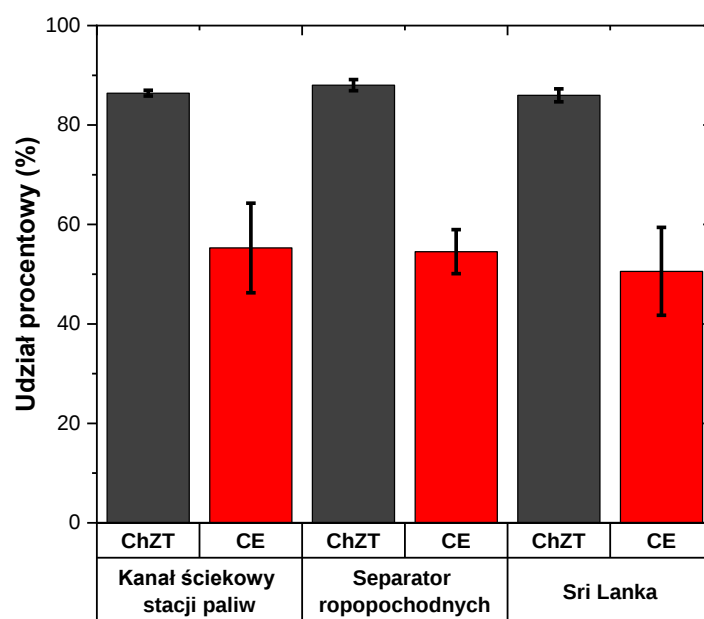
Eksperyment EIS wykazał spadek sumy rezystancji w trakcie całego okresu eksperymentalnego dla każdego z konsorcjów mikrobiologicznych. Przez 9 miesięcy eksperymentu najbardziej stabilnym komponentem, który nie ulegał zmianie oraz nie zależał od rodzaju inokulatu, był komponent R_{M+E} . Wartość rezystancji dla tego komponentu równa była $46,83 \pm 10,74 \Omega$, co świadczy o optymalnym projekcie mikrobiologicznego ogniwa paliwowego. Dużej zmianie ulegał komponent R_A , który

wraz z rozwojem biofilmu elektroaktywnego w każdym z układów bioelektrochemicznych znacząco malał. Komponent ten zmieniał się następująco na przestrzeni czterech pomiarów w 1., 3., 6. i 9. miesiącu pracy ogniów: 1273,01; 652,00; 16,64; 17,03 Ω (kanał ściekowy stacji paliw); 1869,30; 632,56; 21,03; 19,31 Ω (separator ropopochodnych) oraz 1785,03; 850,31; 27,41; 19,47 Ω (Sri Lanka). Komponent R_C , odpowiadający za opory występujące na katodzie, również ulegał zmianom i w trakcie całego eksperymentu wynosił $242,68 \pm 64,22 \Omega$ (wartość średnia wraz z odchyleniem dla wszystkich pomiarów wszystkich ogniów). Krystalizacja soli lub rozwój niechcianego biofilmu na katodzie może negatywnie wpływać na sprawność mikrobiologicznych ogniów paliwowych [261,267]. W tym eksperymencie zmiany rezystancji komponentu katodowego nie były znaczące. Świadczy to o braku negatywnego wpływu tego elementu na proces produkcji prądu elektrycznego.

Podsumowując, układ bioelektrochemiczny zawierający konsorcjum kanału ściekowego stacji paliw na koniec pomiarów elektrochemicznych charakteryzował się najniższym oporem wewnętrznym równym 193,88 Ω (suma wszystkich komponentów). Pozostałe ogniwa zawierające inne inokulaty posiadały rezystancję wewnętrzną odpowiednio 36,79 % (separator ropopochodnych) i 116,38 % (Sri Lanka) wyższą. Dane te wraz z informacjami pozyskanymi z LSV oraz danymi zbieranymi w czasie rzeczywistym, pozwalają określić konsorcjum kanału ściekowego stacji paliw jako najbardziej wydajne energetycznie.

Wydajność kulombowska

Zmiany wartości ChZT i wydajności kulombowskiej (CE) w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych przedstawiono na rysunku 46. Wartość ChZT w świeżej pożywce zawierającej ropę naftową oraz octan sodu była równa 930,17 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, podczas gdy po przetworzeniu substratów w MFC wartość ta wynosiła $110,67 \pm 10,89 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (kanał ściekowy stacji paliw), $107,33 \pm 20,94 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (separator ropopochodnych) oraz $104,01 \pm 24,19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Sri Lanka). Na podstawie tych wartości obliczono zmianę ChZT równą odpowiednio $86,41 \pm 0,58 \%$, $88,02 \pm 1,11 \%$, $85,9 \pm 1,30 \%$ dla wszystkich konsorcjów mikrobiologicznych. Wyniki te przełożyły się na wysokie wartości wydajności kulombowskiej, które wynosiły odpowiednio: $55,28 \pm 9,01 \%$; $54,53 \pm 4,42 \%$ i $50,57 \pm 8,84 \%$ odpowiednio dla każdego z badanych konsorcjów. Dla każdego z pomiarów przedstawiono otrzymane wartości wraz z odchyleniem standardowym.



Rysunek 46 Procentowa zmiana wartości ChZT i obliczona wydajność kulombowska. Wąsami oznaczono odchylenia standardowe pomiarów.

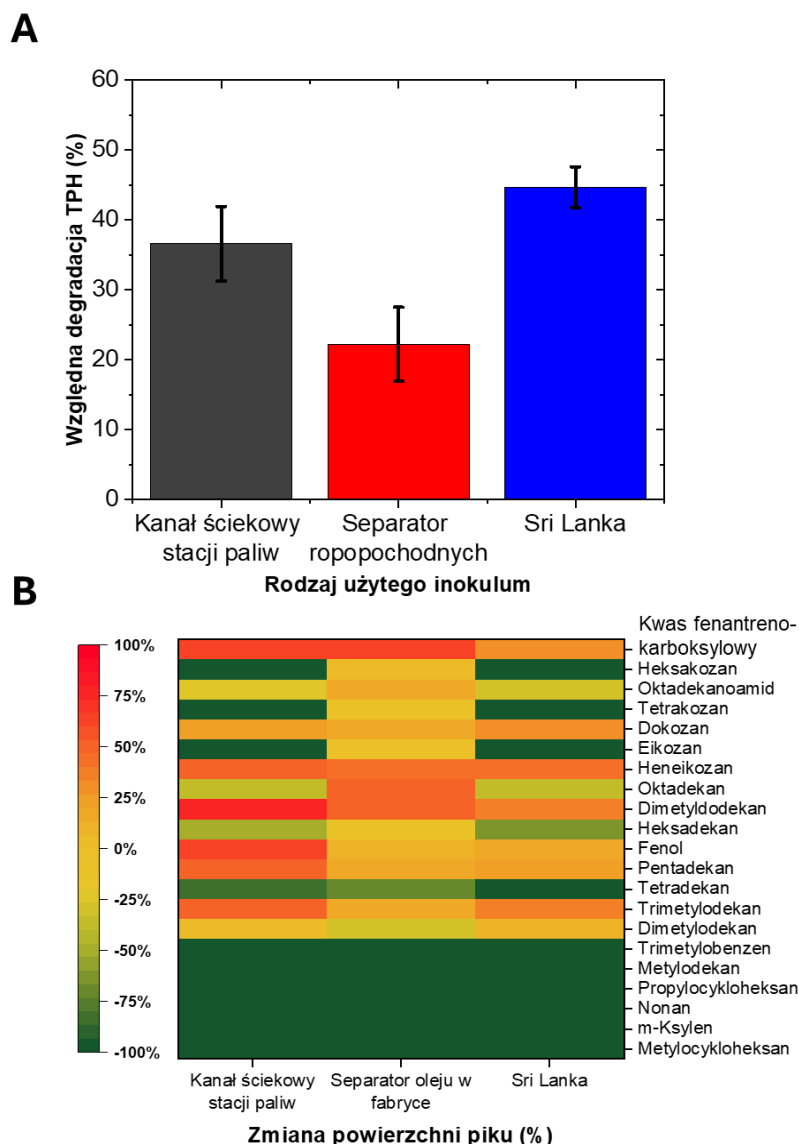
W artykule X. Zhanga i in. wskazano, że na zmianę wartości ChZT duży wpływ ma konstrukcja MFC i warunki pracy bioreaktora [268]. W przeprowadzonym na potrzeby niniejszej pracy eksperymencie zastosowano identyczny projekt dla wszystkich układów bioelektrochemicznych, pracujących w tej samej temperaturze. Pomiary przeprowadzone były w 32. tygodniu eksperymentu, gdy biofilm był już w pełni rozwinięty. Pozwoliło to na zminimalizowanie błędów w pomiarach. Według A. Rochex'ego i in. rozwój stabilnych biofilmów i metabolizm substratów jest skorelowany ze stężeniem źródła azotu w podłożu hodowlanym [269]. W eksperymencie A. de Rosseta i in. wykorzystano NH_4Cl o stężeniu $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, które w literaturze wskazano jako wartość optymalną dla mieszanych konsorcjów mikrobiologicznych degradujących węglowodory [260]. Ponadto wartość ChZT w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych zasilanych związkami ropopochodnymi może ulegać zmianie w zależności od użytych substratów, a jej redukcja może wynosić od 65 do 95 % [246]. Proces degradacji może jednak trwać do 155 dni w zależności od warunków procesu, charakterystyki układu bioelektrochemicznego czy wykorzystanych konsorcjów mikrobiologicznych [8]. W badaniu J. Yua i in. opisano jak wartości CE zmieniają się w MFC degradującym związki ropopochodne. W zależności od wykorzystanego substratu oraz zastosowanych materiałów wartości te wynosiły od 1,02 do 11,01 % [270].

Przedstawione wyniki eksperymentu wskazują na wysoką aktywność mikrobiologiczną zarówno w procesach redukcji zanieczyszczeń, jak i w produkcji prądu elektrycznego. Ważnym aspektem badań był krótki czas potrzebny na osiągnięcie wysokich wyników – czas trwania jednego sygnału po wymianie źródła węgla trwał około 100 godzin. Niewątpliwym wpływem na zwiększenie produkcji prądu miał kosubstrat w postaci octanu sodu, który znacząco poprawił wydajność konsorcjów. Na podstawie powyższych

wyników potwierdzono, że zaprojektowane ogniwa stanowią odpowiednią platformę do rozwoju konsorcjów mikrobiologicznych, umożliwiając im osiągnięcie optymalnych warunków działania. Badane konsorcja wykazywały podobną zmianę wartości ChZT w porównaniu z danymi literaturowymi, jednak uzyskano ją w krótszym czasie niż w innych badaniach [246]. Ponadto, wartości CE były wyższe niż te raportowane w eksperymentach z wykorzystaniem podobnych substratów [270].

7.4.4 Analiza degradacji związków ropopochodnych

Skład anolitu po degradacji w MFC przeanalizowano metodą GC-MS, a otrzymane wyniki pomiarów porównano względem biotycznej kontroli. Jak przedstawiono na rysunku 47A względna degradacja (TPH) wynosiła odpowiednio $36,58 \pm 5,34$ % (kanał ściekowy stacji paliw), $22,20 \pm 5,31$ % (separator ropopochodnych) oraz $44,68 \pm 2,93$ % (Sri Lanka), co było wartością najwyższą w przeprowadzonym doświadczeniu.



Rysunek 47 A – Analiza degradacji związków ropopochodnych w anolicie. Względna degradacji węglowodorów ropopochodnych (TPH). Wąsami oznaczono odchylenia standardowe pomiarów.

B – Względna zmiana powierzchni sygnałów wykrytych związków węglowodorowych w trakcie pomiarów GC-MS.

Współczynnik degradacji poszczególnych składników ropy naftowej przedstawiono na rysunku 47B. Skala kolorów na mapie cieplnej przedstawia procentową zmianę stężenia związków w porównaniu do kontroli: czerwony – akumulację lub produkcję związku, żółty – brak istotnej zmiany w stężeniu danego związku, zielony – degradację związku. Wyniki wykazały, że wszystkie konsorcja degradowały składniki ropy naftowej, takie jak: metylocykloheksan, m-ksylen, nonan, propylocykloheksan, metylodekan, trimetylobenzen. Zaobserwowano jednak różnicę w degradacji pozostałych związków wraz ze wzrostem ich masy molowej. Konsorcjum kanału ściekowego stacji paliw oraz Sri Lanki zdegradowało w wyższym stopniu takie związki jak: eikozan, dokozan, tetrakozan, oktadekanoamid, heksakozan. Wszystkie ogniwa wykazały również akumulację (w próbce po obróbce znajdowało się więcej substancji niż w kontroli) takich związków jak: trimetylodekan, pentadekan, dimetyldodekan, heneikozan, dokozan, kwas fenantrenokarboksylowy.

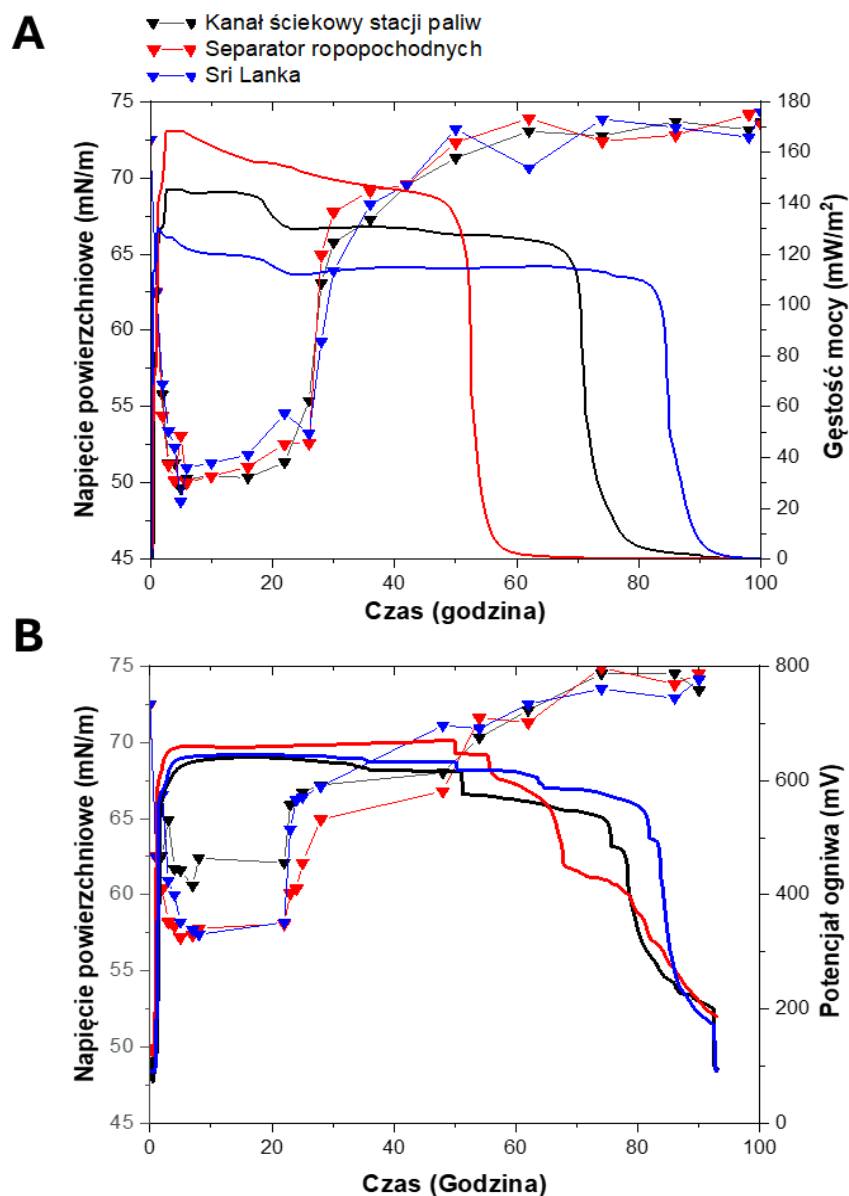
Podsumowując, wszystkie konsorcja mikrobiologiczne były w stanie degradować związki o niskiej masie cząsteczkowej. Różnice we współczynniku degradacji wszystkich węglowodorów ropopochodnych mogły wynikać z mnogości stosowanych ścieżek metabolicznych przez mikroorganizmy oraz akumulacji ropy naftowej na powierzchni biofilmu. Najwyższą wartość degradacji TPH zaobserwowano dla konsorcjum Sri Lanki. Niższego wyniku konsorcjum separatora oleju nie można jednak wytłumaczyć niedojrzałym biofilmem. Układy bioelektrochemiczne obu konsorcjów charakteryzowały się wysokimi wartościami gęstości mocy oraz wysoką zmianą wartości ChZT, co skutkowało ponad 50-ptocentowym współczynnikiem CE. Jak wynika z badań L. Hua i in. rozbieżność w degradacji TPH, zmiany wartości ChZT oraz wydajności kulombowskiej może świadczyć o tym, że dane konsorcjum wykorzystuje szlaki metaboliczne do produkcji prądu, a nie do degradacji węglowodorów ropopochodnych [271].

Wyniki powyższego eksperymentu wskazują na możliwość zastosowania układów bioelektrochemicznych jako efektywnej platformy w degradacji zanieczyszczeń oraz produkcji energii. Wszystkie konsorcja mikrobiologiczne były zdolne do degradacji związków ropopochodnych, jednak jakość tego procesu różniła się w zależności od rodzaju użytego konsorcjum. Konsorcja pochodzące z kanału ściekowego stacji paliw oraz z Sri Lanki były bardziej wydajne niż konsorcjum z separatora oleju. Wszystkie konsorcja skutecznie degradowały związki o stosunkowo niskich masach cząsteczkowych, natomiast bardziej odporne związki najlepiej rozkładało konsorcjum Sri Lanki, osiągając najwyższy poziom degradacji TPH. Ponadto, wszystkie zastosowane w eksperymencie ogniwa charakteryzowały się wysoką produkcją prądu elektrycznego, na podstawie czego stwierdzono, że metabolizm mikroorganizmów w konsorcjach skupiał się na degradacji zanieczyszczeń, a nie na produkcji biofilmu. Wyniki te wskazują na potencjał zastosowania układów bioelektrochemicznych jako efektywnej platformy zarówno do degradacji zanieczyszczeń, jak i produkcji energii.

7.4.5 Analiza przeprowadzonych pomiarów napięcia powierzchniowego

Przy pomocy pęcherzykowego napięcia powierzchniowego zbadano przebieg syntezy biosurfaktantów w anolicie. W 32. tygodniu eksperymentu zmierzono zmianę napięcia powierzchniowego w trakcie pełnego cyklu zasilania dla wszystkich konsorcjów mikrobiologicznych, a otrzymane wyniki porównano z próbą abiotyczną oraz danymi otrzymanymi w reżimie otwartego obwodu napięcia. W zależności od warunków środowiskowych w układach bioelektrochemicznych produkcja biosurfaktantów przez mikroorganizmy może odbywać się tlenowo, mikroaerobowo lub beztlenowo. Wykryty w badaniu spadek napięcia powierzchniowego spowodowany był obecnością oraz wzrostem stężenia biosurfaktantów w anolitach w warunkach mikroareofilnych (stężenie tlenu w komorze anodowej równe było 7,2 %). Wyniki badań przedstawiono na rysunku 48 oraz w tabeli 11.

W przeciągu godziny od zasilania w każdym układzie bioelektrochemicznym zaobserwowano spadek napięcia powierzchniowego z $72,2 \pm 0,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (wartość kontroli abiotycznej) do wartości $62,5 \pm 0,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ dla kanału ściekowego, $61,3 \pm 0,3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ separatora ropopochodnych i $63,4 \pm 0,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ Sri Lanki. Dalszy spadek napięcia powierzchniowego obserwowany był dla wszystkich ogni. Po dwóch godzinach od zasilania zaobserwowano zmiany wartości napięcia powierzchniowego równe $55,8 \pm 0,3$, $54,4 \pm 0,6$ i $56,5 \pm 0,9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, które uzyskano odpowiednio dla kanału ściekowego, separatora ropopochodnych i Sri Lanki. Następnie (po 5 godzinach od zasilania) zaobserwowano najniższe wartości napięcia powierzchniowego w trakcie badania. Wartości te równe były $49,7 \pm 0,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ dla kanału ściekowego i $48,8 \pm 0,9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ dla Sri Lanki. Próbkę konsorcjum Sri Lanka poddano dodatkowemu procesowi precypitacji kwasem solnym, ekstrakcji, odparowania rozpuszczalnika oraz ponownego rozpuszczenia. Tak przygotowana próbka osiągnęła napięcie powierzchniowe równe $42,4 \pm 0,4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, co było wynikiem o 13,1 % niższym w porównaniu do wartości zmierzonej bezpośrednio podczas pomiarów wykonanych w ogniwie. Niektóre biosurfaktanty mogą obniżać napięcie powierzchniowe do wartości w przedziale od $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ [66] do $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ [83]. Powyższy wynik może świadczyć o tym, że otrzymany związek obniżający napięcie powierzchniowe był zanieczyszczony.



Rysunek 48 Wykres zmiany napięcia powierzchniowego w trakcie trwania cyklu karmienia. **A** – Wykres dla danych otrzymanych w reżimie produkcji prądu. **B** – Wykres dla danych otrzymanych w reżimie otwartego obwodu napięcia (OCV).

Zgodnie z opisem w badaniach N.H. Youssefa, S.F. Burlatsky'ego i in. napięcie powierzchniowe roztworu surfaktantu maleje liniowo wraz ze wzrostem stężenia cząsteczek surfaktantu w układzie, aż do osiągnięcia CMC [272,273]. Związki te zaczynają być wykorzystane do agregacji i zwiększaniu biodostępności hydrofobowych substratów, co może potwierdzać znaczący wzrost gęstości mocy. W przeprowadzonym na potrzeby tej pracy eksperymencie po około pięciu godzinach po wymianie pożywki obserwowany był wzrost napięcia powierzchniowego w ogniwie dążący ostatecznie do wartości wyższych niż początkowe. Zmiana ta trwała do momentu aż substraty nie zostały ostatecznie wyczerpane, a produkcja prądu elektrycznego nie zmalała do zera. Podobne właściwości zaobserwowano również w pracy G. Pasternaka i in., w której wykorzystano substrat hydrofobowy w postaci oleju posmażalniczego

w mikrobiologicznym ogniwie paliwowym [112]. Opisany w tym rozdziale eksperyment potwierdza wspomniane obserwacje, ale równocześnie udowadnia możliwość produkcji biosurfaktantów z ropy naftowej, co nie zostało zaobserwowane w innych eksperymentach. Dodatkowo, jak opisano w pracach G. Pasternaka i P.M. Dominguesa i in. w warunkach mikroaerofilnych możliwa jest biosynteza związków powierzchniowo czynnych przez gatunki, takie jak *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfovibrio* i *Geobacillus* [112,274]. W opisanych powyżej układach eksperymentalnych zmierzony poziom tlenu wskazuje na takie warunki.

Otrzymane wyniki napięcia powierzchniowego w układach bioelektrochemicznych porównano z wynikami z hodowli mikrobiologicznych. Sprawdzono w nich również wpływ innych substratów na produkcję biosurfaktantów takich jak: ropa naftowa, ropa naftowa z octanem sodu i posmażalniczy olej roślinny. W badaniu V.K. Gaura i in. wykazano, że składniki zawarte w oleju posmażalniczym mogą skutecznie ulegać biokonwersji do biosurfaktantów w hodowlach mikrobiologicznych i układach bioelektrochemicznych [275]. Dodatkowo w badaniu A. de Rosseta i in. wykazano, że produkcja biosurfaktantów w hodowlach mikrobiologicznych może doświadczać zaburzenia szlaków metabolicznych mikroorganizmów, które spowodowane są nadmiernym obciążeniem azotem w reaktorze, a tym samym ograniczać syntezę nowych związków [260]. Spadki napięcia powierzchniowego w hodowlach zaobserwowano dopiero po 5 lub 6 tygodniach, co było dłuższym czasem niż w układach bioelektrochemicznych, gdzie spadek występował już po 5 godzinach. Wartości napięcia powierzchniowego w kulturach różniły się w zależności od zastosowanego substratu: ropa naftowa ($58,9 \pm 1,1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$), ropa naftowa z octanem sodu ($53,3 \pm 0,8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) oraz ropa naftowa z olejem roślinnym posmażalniczym ($52,3 \pm 1,2 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$). Były to wartości wyższe w porównaniu do tych uzyskanych w układach bioelektrochemicznych. Dane te wskazują, że proces biokonwersji węglowodorów ropopochodnych do biosurfaktantów jest bardziej efektywny przy zastosowaniu dodatkowego, prostego substratu oraz w warunkach układu bioelektrochemicznego, co również zaobserwowano w badaniu G. Pasternaka i in. [156]. Wydajność tego procesu była jednak niższa w porównaniu do produkcji biosurfaktantów bezpośrednio w MFC. Co więcej, przedstawione powyżej wyniki badań stanowią pierwsze dowody na produkcję związków powierzchniowo czynnych (biosurfaktantów) bezpośrednio z węglowodorów zawartych w ropie naftowej w układach bioelektrochemicznych. Dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na zastosowaniu bardziej przystępnych substratów, takich jak odpady olejowe lub cukry, jako źródła węgla do syntezy biosurfaktantów. Wyniki te pokazują, że mikroorganizmy mogą skutecznie przekształcać bardziej złożone i trudniej degradowane związki ropopochodne w surfaktanty, co otwiera nowe możliwości dla biotechnologii w zakresie remediacji środowiskowej i produkcji biosurfaktantów na skalę przemysłową.

Tabela 11 Minimalne wartości napięcia powierzchniowego wykryte w trakcie pomiarów. Porównanie mikrobiologicznych kultur butelkowych z układami bioelektrochemicznymi, w których wykorzystano inokulat Sri Lanki.

Pochodzenie próbki		Źródło węgla	Napięcie powierzchniowe (mN·m ⁻¹)	Czas od zmiany pożywki do najniższej zaobserwowanej wartości napięcia powierzchniowego
Kontrola abiotyczna (soli mineralnych, octanu sodu i ropy naftowej)		N/A	72,2 ± 0,5	N/A
Mikrobiologiczna kultura butelkowa		Ropa naftowa	58,9 ± 1,1	6 tygodni
		Ropa naftowa, octan sodu	53,3 ± 0,8	5 tygodni
		Ropa naftowa, posmażalniczy olej roślinny	52,3 ± 1,2	5 tygodni
Układ bioelektrochemiczny	Układ o obwodzie otwartym	Ropa naftowa, octan sodu	57,4 ± 0,9	7 godzin
	Układ o obwodzie zamkniętym		48,8 ± 0,9	4 godziny
	Wyekstrahowany i ponownie rozpuszczony produkt		42,4 ± 0,4	N/A

7.4.6 Analiza chemiczna otrzymanych produktów degradacji ropy naftowej

Analiza LC-MS/MS umożliwiła identyfikację pięciu rodzajów ramnolipidów, które sklasyfikowano jako mono- i diramnolipidy. W grupie monoramnolipidów wykryto Rha-C10-C10, Rha-C8-C10/Rha-C10-C8. W grupie diramnolipidów zaobserwowano: Rha-Rha-C10, Rha-Rha-C10-C10/Rha-Rha-C10-C10 oraz Rha-Rha-C10-C12/Rha-Rha-C12-C10. W tabeli 12 przedstawiono wartości m/z i czasu retencji otrzymane dla poszczególnych związków ramnolipidów. We wcześniejszych badaniach wykazano zdolność mikroorganizmów z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* do produkcji biosurfaktantów, między innymi w układach bioelektrochemicznych. W badaniach tych wykorzystano jednak węglowodory i kwasy tłuszczowe zawarte w zużytych olejach posmażalniczych [98,260]. Dodatkowo, podczas wcześniej opisanych w literaturze badań produkcji biosurfaktantów w BES opisane zostały przykłady, gdzie wykorzystywano dedykowane czyste i zmodyfikowane kultury bakteryjne [98,159,276]. Zgodnie z obecną

wiedzą, jest to pierwsza praca, w której zbadano produkcję biosurfaktantów ze związków ropopochodnych znajdujących się w ropie naftowej.

Tabela 12 Rodzaje wykrytych związków powierzchniowo czynnych w trakcie pomiarów LC-MS.

LP	m/z	Rodzaj wykrytego Ramnolipidu	Wzór związku	Czas retencji [min]	Identyfikator Lipidmap	Środowisko mikrobiologiczne
1.	475,29	Rha-C8-C10/Rha-C10-C8	$C_{24}H_{44}O_9$	2,94	LMFA130300	Kanał ściekowy stacji paliw, Separator ropopochodnych, Sri Lanka
2.	503,32	Rha-C10-C10	$C_{26}H_{48}O_9$	2,76	LMFA13030001	Kanał ściekowy stacji paliw, Separator ropopochodnych
3.	649,38	Rha-Rha-C10-C10/Rha-Rh-C10-C10	$C_{32}H_{58}O_{13}$	2,65	LMFA13030005	Kanał ściekowy stacji paliw, Separator ropopochodnych, Sri Lanka
4.	677,41	Rha-Rha-C10-C12/Rha-Rha-C12-C10	$C_{34}H_{62}O_{13}$	2,85	-	Kanał ściekowy stacji paliw, Separator ropopochodnych, Sri Lanka
5.	479,25	Rha-Rha-C10	$C_{22}H_{40}O_{11}$	2,65	LMFA13030006	Separator ropopochodnych

7.4.7 Podsumowanie i wnioski

W opisanym powyżej eksperymencie oceniono trzy konsorcja mikrobiologiczne pod kątem wydajności produkcji energii elektrycznej oraz syntezy biosurfaktantów w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych. W tym celu jako źródło węgla wykorzystano mieszaninę węglowodorów ropopochodnych ropy naftowej. Zaobserwowana produkcja energii elektrycznej wskazywała na wysoką wydajność energetyczną konsorcjów mikrobiologicznych. Maksymalną gęstość mocy ($221,68 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) oraz wydajność kulombowską równą $55,28 \pm 9,01 \%$ zaobserwowano dla konsorcjum gleby kanału ściekowego stacji paliw. W ogniwie tym zaobserwowano również najniższą wartość oporu wewnętrznego w długim czasie eksperymentalnym. Wcześniejsza analiza dla tych konsorcjów wykazała możliwą obecność producentów biosurfaktantów, takich jak *Pseudomonas aeruginosa*, wraz z innymi gatunkami bakterii elektroaktywnych, które biosyntetyzowały związki powierzchniowo czynne oraz degradowały związki ropopochodne. Badania napięcia powierzchniowego wykazały obecność biosurfaktantów we wszystkich ogniwach mikrobiologicznych. Konsorcjum gleb azjatyckich Sri Lanki charakteryzowało się największą zmianą napięcia powierzchniowego z $72,2 \pm 0,5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ (dla kontroli biotycznej) do $48,8 \pm 0,9 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ (dla anolitu) w przeciągu 5 godzin od wymiany podłoża. Konsorcjum to miało również najwyższy stopień degradacji wszystkich związków ropopochodnych w mieszaninie anolitu ($35,95 \pm 1,04 \%$) oraz wysoką zmianę wartości ChZT ($85,9 \pm 1,30 \%$). Aktywność mikrobiologiczna skutkowała biosyntezą pięciu rodzajów mono- i diramnofolipidów wykrytych metodą metaboliczną, z czego największa ich liczba została wyprodukowana przez konsorcjum gleby kanału ściekowego stacji paliw oraz separatora ropopochodnych.

Przeprowadzony eksperyment potwierdził, że układy bioelektrochemiczne mogą być skutecznym narzędziem do biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych, nawet bez dodatkowego przyłożenia potencjału elektrycznego. Uzyskane wyniki wykazały, że w takich układach możliwa jest efektywna degradacja związków ropopochodnych, które ze względu na swoje właściwości hydrofobowe stanowią wyzwanie dla konwencjonalnych metod remediacji. Zastosowane MFC charakteryzowały się również zdolnością do długoterminowej produkcji prądu elektrycznego oraz możliwością częściowej regeneracji wydajności, co podkreśla ich potencjał do zastosowań praktycznych. Jednym z kluczowych wyników tej pracy jest udowodnienie możliwości produkcji biosurfaktantów z ropy naftowej w MFC. Zdolność do generowania biosurfaktantów bezpośrednio z substratów ropopochodnych może znacząco zwiększyć efektywność biodegradacji, a także obniżyć koszty, eliminując potrzebę stosowania zewnętrznych surfaktantów.

Podsumowując, wykorzystanie BES jako platformy do jednoczesnej degradacji zanieczyszczeń i produkcji wartościowych związków, takich jak biosurfaktanty, stwarza nowe możliwości zastosowań biotechnologicznych, zwłaszcza w obszarze remediacji środowiskowej oraz w przemyśle chemicznym i petrochemicznym.

VIII. Podsumowanie

Głównym celem rozprawy doktorskiej była ocena możliwości zastosowania układów bioelektrochemicznych w procesie degradacji związków ropopochodnych przy jednoczesnej produkcji związków powierzchniowo czynnych. Rozprawa ta dostarcza informacji na temat wpływu kluczowych parametrów, takich jak potencjał elektrody czy materiały elektrodowe. Dodatkowo przedstawia zastosowanie związków zwiększających wydajność procesu produkcji energii elektrycznej i degradacji zanieczyszczeń ropopochodnych (enzymu lakazy oraz kosubstratu octanu sodu).

Badania przeprowadzone w ramach pracy były podzielone na kilka etapów. W pierwszym z nich analizowano wpływ użytego potencjału na wzbogacenie elektroaktywnych społeczności bakterii zdolnych do degradacji związków ropopochodnych. Wykazano, że odpowiedni dobór potencjału anody, może znacząco zwiększyć produkcję prądu elektrycznego oraz poprawić wydajność procesu degradacji zanieczyszczeń. Potencjałem, który skutkował najwyższą aktywnością mikroorganizmów był potencjał $-0.3 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Co więcej wykazano, że różnorodność mikrobiologiczna kontrolowana przez potencjał anody, ma kluczowe znaczenie dla skuteczności konwersji związków ropopochodnych na energię elektryczną, co jest związane z występowaniem bakterii produkujących biosurfaktanty w elektroaktywnym biofilmie.

W kolejnej części rozprawy opisano badania nad zwiększeniem wydajności procesu produkcji prądu elektrycznego poprzez zastosowanie różnych materiałów anodowych. Stwierdzono, że anody wykonane z wełny ze stali nierdzewnej są najbardziej efektywne pod względem produkcji prądu. Anody wykonane z tego materiału charakteryzowały się najwyższymi wartościami gęstości prądu w trakcie okresu eksperymentalnego, niezależnie od rodzaju wykorzystanego substratu. Dodatkowym celem tego badania było zwiększenie stopnia degradacji ropy naftowej poprzez zastosowanie enzymu lakazy oraz kosubstratu w formie octanu sodu. Dodatek lakazy do mieszaniny anolitu skutkował zwiększeniem stopnia degradacji związków ropopochodnych, podczas gdy zastosowanie kosubstratu skutkowało znaczącym wzrostem produkowanej energii elektrycznej. Wyniki te podkreślają potencjał zastosowania obu zaproponowanych strategii w przyszłych aplikacjach bioremediacyjnych.

W trzecim eksperymencie zbadano efektywność produkcji gęstości mocy i degradacji związków ropopochodnych różnych konsorcjów mikrobiologicznych. Eksperyment ten miał na celu selekcję najbardziej wydajnych konsorcjów. Mikrobiologiczne konsorcja gleb oraz środowisk wodnych są bogate w mikroorganizmy, a część z nich produkuje biosurfaktanty. Produkowane związki powierzchniowo czynne wpływają pozytywnie na degradację związków ropopochodnych i produkcję prądu elektrycznego. Wyniki wykazały istotne różnice w wydajności poszczególnych konsorcjów zarówno pod względem produkcji prądu elektrycznego jak i degradacji związków ropopochodnych. W trakcie eksperymentu konsorcja: gleby Sri Lanki, separatora ropopochodnych oraz kanału ściekowego stacji paliw charakteryzowały się najwyższymi wartościami gęstości mocy oraz degradacji zanieczyszczeń ropopochodnych. Zaprezentowane wyniki mogą

być istotne w kontekście praktycznego wykorzystania konsorcjów mikrobiologicznych w biotechnologii, ponieważ przedstawiają ich efektywność w procesie degradacji związków ropopochodnych przy jednoczesnej produkcji prądu elektrycznego.

Ostatni eksperyment miał na celu ocenę zdolności wybranych konsorcjów mikrobiologicznych do produkcji biosurfaktantów oraz ich wpływ na degradację związków ropopochodnych. Badania wykazały, że środowiska mikrobiologiczne mogą produkować zarówno energię elektryczną, jak i biosurfaktanty (mono- i diramnolipidy). Produkcja związków powierzchniowo czynnych bezpośrednio w układach bioelektrochemicznych korzystnie wpływa na produkcję prądu elektrycznego, degradację związków hydrofobowych oraz wydłuża czas działania samego ogniwa. Wyniki te otwierają nowe możliwe zastosowania układów bioelektrochemicznych w procesach biodegradacji zanieczyszczeń i produkcji związków chemicznych.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska dostarcza informacji niezbędnych przy projektowaniu układów bioelektrochemicznych wykorzystywanych w celu bioremediacji środowisk zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów mogą być przydatne dla dalszego rozwoju technologii układów bioelektrochemicznych, biodegradacji oraz produkcji biosurfaktantów, a także dla praktycznych zastosowań tych technologii w ochronie środowiska. Osiągnięcia te mogą stanowić fundament dla przyszłych badań oraz wdrożeń układów bioelektrochemicznych na większą skalę, wspierając rozwój bardziej zrównoważonych i efektywnych metod bioremediacji.

IX. Dorobek naukowy

9.1 Publikacje naukowe

- **Bartosz Widera, Natalia Tyszkiewicz, Jaak Truu, Piotr Rutkowski, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak:** Relationship between biodiversity and power generated by anodic bacteria enriched from petroleum-contaminated soil at various potentials. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2024, vol. 194, art. 105849, s. 1-13. ISSN: 0964-8305; 1879-0208
- **Grzegorz Pasternak, Aleksander M. de Rosset, Natalia Tyszkiewicz, Bartosz Widera, John Greenman, Ioannis Ieropoulos:** Prevention and removal of membrane and separator biofouling in bioelectrochemical systems: a comprehensive review. *iScience*. 2022, vol. 25, nr 7, art. 104510, s. 1-21. ISSN: 2589-0042

9.2 Wystąpienia konferencyjne

- **Bartosz Widera, Pavaris Viwatthanasittiphong, Piotr Rutkowski, Sven Kerzenmacher, Grzegorz Pasternak:** Enhancing the efficiency of bioelectrochemical crude oil degradation: anode materials and the use of laccase. W: Phoenix Cost Action CA19123 - protection, resilience, rehabilitation of damaged environment, Final conference, Naples, 4-5 July 2024 : book of abstracts / eds. Paola Grenni [i in.]. [B.m.] : Water Research institute, National Research Council of Italy (IRSA-CNR), 2024. s. 36-36.
- **Bartosz Widera, Piotr Rutkowski, Grzegorz Pasternak:** Bioelectrochemical stimulation of biodegradation of petroleum products in bioelectrochemical systems. W: Interdisciplinary Doctoral Symposium : Rajd Doktoranta 2024, Przesieka, 17-19 May 2024 : book of abstracts / eds. Daria Minta [i in.]. Wrocław: Wrocław University of Science and Technology Publishing House, 2024. s. 43-43. ISBN: 978-83-7493-276-9
- **Bartosz Widera, Piotr Rutkowski, Natalia Tyszkiewicz, Grzegorz Pasternak:** Degradation of crude oil compounds in microbial fuel cells accompanied with biosurfactant productions. W: Electromicrobiology 2023, May 24-26, 2023, Aarhus, Denmark / Center for Electromicrobiology, Aarhus University. [B.m.: b.w., 2023]. s. 40-40.
- **Bartosz Widera, Grzegorz Pasternak:** Crude oil biodegradation in Microbial Fuel Cells accompanied with biosurfactant synthesis. W: ISMET 8 2022 Global Conference, The International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, Chania, Crete, Greece, 19-23 Sept 2022 : e-book of abstracts / eds. N. Kalogerakis, A. Esteve-Núñez. Chania : Technical University of Crete, cop. 2022. s. 40-40. ISBN: 978-618-5558-02-4
- **Bartosz Widera, Grzegorz Pasternak:** Enrichment of electroactive biofilm obtained from soil contaminated with petroleum substances by using the

chronoamperometric technique. W: Electromicrobiology 2021, November 3rd-5th 2021, Aarhus, Denmark / Center for Electromicrobiology, Aarhus University. [B.m. : b.w., 2021]. s. 40-40.

- **Bartosz Widera, Grzegorz Pasternak:** Potentiostatic enrichment of electroactive biofilm communities derived from soil contaminated with petroleum products. W: 5th European Meeting of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, 13th-15th September, online / ISMET International Society for Microbial Electrochemistry and Technology. [B.m. : b.w., 2021]. s. 160-160.
- **Bartosz Widera, Grzegorz Pasternak:** Increasing MFC performance through operational and design parameters. W: ChemBiotIC, Chemistry & Biotechnology International Conference: June 24-25 2021, Wrocław, Polska / Politechnika Wrocławska. [Wrocław : Oficyna Wydawnicza PWr, 2021]. s. 95-95. ISBN: 978-83-7493-174-8

9.3 Udział w projektach i grantach naukowych

- Realizacja badań w ramach grantu OPUS-17 Narodowego Centrum nauki (NCN) (nr grantu: **2019/33/B/NZ9/02774**), w roli stypendysty na Politechnice Wrocławskiej, Polska, 10.2020 – 09.2024
- Pozyskanie grantu zewnętrznego, wykonanie badań oraz rozliczenie grantu krótkoterminowej misji naukowej (Short Term Scientific Mission – STSM) w ramach programu E-COST (nr grantu: **E-COST-GRANT-CA19123-7315a708**) zrealizowanej na Uniwersytecie w Bremie, Niemcy, 03-05.2023

9.4 Pozostała działalność naukowa

- Uczestnictwo w warsztatach „8th Workshop on „Microbial bioelectrotechnology: A platform initiative for Germany” – Research Group Environmental Process Engineering University of Bremen, Brema, Niemcy, 3-4.05.2023
- Prezentacja referatu w trakcie Webinarium organizowanym przez Studenckie Koła Naukowe Chemików "Orbital" Uniwersytetu Łódzkiego. 28.02.2022
- Uczestnictwo w warsztatach "WG3 meeting and workshop,, - DC converters for Energy Harvesting applications (special care of low-power applications): Main steps in the design of integrated DC/DC converters”, EU-COST Phoenix 19123, Rzym, Włochy, 14-17.02.2022

X. Bibliografia

- [1] R.R. Colwell, J.D. Walker, J.J. Cooney, Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment, *Crit. Rev. Microbiol.* 5 (1977) 423–445. <https://doi.org/10.3109/10408417709102813>.
- [2] M. Nie, Y. Wang, J. Yu, M. Xiao, L. Jiang, J. Yang, C. Fang, J. Chen, B. Li, Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum-polluted soil, *PLoS One.* 6 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017961>.
- [3] M.I. Ramirez, A.P. Arevalo, S. Sotomayor, N. Bailon-Moscoso, Contamination by oil crude extraction – Refinement and their effects on human health, *Environ. Pollut.* 231 (2017) 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.017>.
- [4] J.N. Bianchin, G. Nardini, J. Merib, A.N. Dias, E. Martendal, E. Carasek, Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextra, *J. Chromatogr. A.* 1233 (2012) 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.022>.
- [5] P. Poinot, F. Qin, M. Lemoine, V. Yvon, J. Ledauphin, J.L. Gaillard, Study of current analytical strategies for the dual investigation of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in apples, *J. Food Compos. Anal.* 35 (2014) 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.06.003>.
- [6] S.J. Varjani, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, *Bioresour. Technol.* 223 (2017) 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>.
- [7] F. Abbasian, R. Lockington, M. Mallavarapu, R. Naidu, A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176 (2015) 670–699. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>.
- [8] Y. He, Q. Zhou, F. Mo, T. Li, J. Liu, Bioelectrochemical degradation of petroleum hydrocarbons: A critical review and future perspectives, *Environ. Pollut.* 306 (2022) 119344. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119344>.
- [9] C.B. Chikere, G.C. Okpokwasili, B.O. Chikere, Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil, *3 Biotech.* 1 (2011) 117–138. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0014-8>.
- [10] R.J. Ouellette, J.D. Rawn, Alkanes and Cycloalkanes: Structures and Reactions, 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812838-1.50004-9>.
- [11] F. Rojo, Degradation of alkanes by bacteria: Minireview, *Environ. Microbiol.* 11 (2009) 2477–2490. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>.
- [12] J. Foght, Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15 (2008) 93–120. <https://doi.org/10.1159/000121324>.
- [13] M. Senthil kumar, V. Sivasankar, G.V.T. Gopalakrishna, Quantification of benzene

- in groundwater sources and risk analysis in a popular South Indian Pilgrimage City – A GIS based approach, *Arab. J. Chem.* 10 (2017) S2523–S2533. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.022>.
- [14] A.B. Patel, S. Shaikh, K.R. Jain, C. Desai, D. Madamwar, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches, *Front. Microbiol.* 11 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813>.
 - [15] A. Tiehm, A. Müller, S. Alt, H. Jacob, H. Schad, C. Weingran, A. Tiehm, A. Müller, S. Alt, H. Jacob, H. Schad, C. Weingran, Development of a groundwater biobarrier for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons, BTEX, and heterocyclic hydrocarbons, *Water Sci. Technol.* 58 (2008) 1349–1355. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.730>.
 - [16] S.J. Johnson, K.J. Woolhouse, H. Prommer, D.A. Barry, N. Christofi, Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater, *Eng. Geol.* 70 (2003) 343–349. [https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(03\)00102-9](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(03)00102-9).
 - [17] M.W. Lim, E. Von Lau, P.E. Poh, A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions, *Mar. Pollut. Bull.* 109 (2016) 14–45. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.023>.
 - [18] A. Hamzah, C.W. Phan, N.F. Abu Bakar, K.K. Wong, Biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortia and the constituent single bacteria isolated from Malaysia, *Bioremediat. J.* 17 (2013) 1–10. <https://doi.org/10.1080/10889868.2012.731447>.
 - [19] Biodegradation and Persistence.pdf, (2001) 338.
 - [20] N. Das, P. Chandran, Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview, *Biotechnol. Res. Int.* 2011 (2011) 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>.
 - [21] K.J. Rockne, S.E. Strand, Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3962–3967. <https://doi.org/10.1021/es980368k>.
 - [22] S. Lundstedt, Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and Staffan Lundstedt, 2003.
 - [23] A.R. Johnsen, L.Y. Wick, H. Harms, Principles of microbial PAH-degradation in soil, *Environ. Pollut.* 133 (2005) 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>.
 - [24] L. Levin, A. Viale, A. Forchiassin, Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52 (2003) 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00091-4).
 - [25] D. Gao, L. Du, J. Yang, W.M. Wu, H. Liang, A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control, *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (2010) 70–77. <https://doi.org/10.3109/07388550903427272>.
 - [26] A. Carocci, A. Catalano, G. Lauria, M.S. Sinicropi, G. Genchi, Brief History of the

Development of the Transfusion Service, How to Recruit Volunt. Donors Third World? 238 (2015) 22–28. <https://doi.org/10.1007/398>.

- [27] C. Chen, Z. Zhang, P. Xu, H. Hu, H. Tang, Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ. Res.* 223 (2023) 115472. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115472>.
- [28] G. Muyzer, A.J.M. Stams, The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008) 441–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>.
- [29] Z. Chen, Y. Jiang, Z. Chang, J. Wang, X. Song, Z. Huang, S. Chen, J. Li, Denitrification characteristics and pathways of a facultative anaerobic denitrifying strain, *Pseudomonas denitrificans* G1, *J. Biosci. Bioeng.* 129 (2020) 715–722. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.12.011>.
- [30] P. Northwest, Environmental processes mediated by iron-reducing bacteria .James K Fredrickson* and Yuri A Gorby, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (1996) 28–294.
- [31] A. Nzila, Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: Overview of studies, proposed pathways and future perspectives, *Environ. Pollut.* 239 (2018) 788–802. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.074>.
- [32] A. Nzila, Mini review: Update on bioaugmentation in anaerobic processes for biogas production, *Anaerobe.* 46 (2017) 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.11.007>.
- [33] A. Dzionek, D. Wojcieszńska, U. Guzik, Natural carriers in bioremediation: A review, *Electron. J. Biotechnol.* 23 (2016) 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>.
- [34] M. Wu, W. Li, W.A. Dick, X. Ye, K. Chen, D. Kost, L. Chen, Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination, *Chemosphere.* 169 (2017) 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.059>.
- [35] M D Yuniati, Bioremediation of petroleum-contaminated soil : A Review Bioremediation of petroleum-contaminated soil : A Review, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 118 (2018) 1–7.
- [36] Z. Wang, Y. Xu, J. Zhao, F. Li, D. Gao, B. Xing, Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation, *J. Hazard. Mater.* 190 (2011) 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.103>.
- [37] M.E. Mancera-López, F. Esparza-García, B. Chávez-Gómez, R. Rodríguez-Vázquez, G. Saucedo-Castañeda, J. Barrera-Cortés, Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61 (2008) 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.05.012>.
- [38] S. Khan, A.K. Tripathi, R. Srivastava, M.S. Saleem, S. Yeremenko, V. Sydorenko, Bioremediation of Petroleum Contamination: A Short Review, *Ecol. Quest.* 33

(2022) 43–52. <https://doi.org/10.12775/EQ.2022.012>.

- [39] R.M. Atlas, Effects of Temperature and Crude Oil Composition on Petroleum Biodegradation, *Appl. Microbiol.* 30 (1975) 396–403. <https://doi.org/10.1128/am.30.3.396-403.1975>.
- [40] J.M. Foght, D.W.S. Westlake, W.M. Johnson, H.F. Ridgway, Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques, *Microbiology*. 142 (1996) 2333–2340. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-9-2333>.
- [41] D. Delille, F. Coulon, E. Pelletier, Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils, *Cold Reg. Sci. Technol.* 40 (2004) 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2004.05.005>.
- [42] J.J. Cooney, S.A. Silver, E.A. Beck, Factors influencing hydrocarbon degradation in three freshwater lakes, *Microb. Ecol.* 11 (1985) 127–137. <https://doi.org/10.1007/BF02010485>.
- [43] M.J. Jordan, J.E. Hobbie, B.J. Peterson, Effect of Petroleum Hydrocarbons on Microbial Populations in an Arctic Lake, *Arctic*. 31 (1978). <https://doi.org/10.14430/arctic2651>.
- [44] W.J. Mitsch, B. Bernal, A.M. Nahlik, Ü. Mander, L. Zhang, C.J. Anderson, S.E. Jørgensen, H. Brix, Wetlands, carbon, and climate change, *Landsc. Ecol.* 28 (2013) 583–597. <https://doi.org/10.1007/s10980-012-9758-8>.
- [45] S.J. Kim, D.H. Choi, D.S. Sim, Y.S. Oh, Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand, *Chemosphere*. 59 (2005) 845–852. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.058>.
- [46] C.H. Chaîneau, G. Rougeux, C. Yéprémian, J. Oudot, Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil, *Soil Biol. Biochem.* 37 (2005) 1490–1497. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.01.012>.
- [47] L.M. Carmichael, F.K. Pfaender, The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils, *Biodegradation*. 8 (1997) 1–13. <https://doi.org/10.1023/A:1008258720649>.
- [48] M. Parhamfar, H. Abtahi, K. Godini, R. Saeedi, M. Sartaj, J. Villaseñor, F. Coulon, V. Kumar, T. Soltanighias, E. Ghaznavi-Rad, A. Koolivand, Biodegradation of heavy oily sludge by a two-step inoculation composting process using synergistic effect of indigenous isolated bacteria, *Process Biochem.* 91 (2020) 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.014>.
- [49] M.S. Poorsoleiman, S.A. Hosseini, A. Etminan, H. Abtahi, A. Koolivand, Effect of two-step bioaugmentation of an indigenous bacterial strain isolated from oily waste sludge on petroleum hydrocarbons biodegradation: Scaling-up from a liquid mineral medium to a two-stage composting process, *Environ. Technol.*

Innov. 17 (2020) 100558. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100558>.

- [50] M.S. Poorsoleiman, S.A. Hosseini, A. Etminan, H. Abtahi, A. Koolivand, Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons by Using a Two-Step Inoculation Composting Process Scaled-Up from a Mineral-Based Medium: Effect of Biostimulation of an Indigenous Bacterial Strain, Waste and Biomass Valorization. 12 (2021) 2089–2096. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01140-z>.
- [51] Q.S. Li, J. Ogawa, R.D. Schmid, S. Shimizu, Engineering Cytochrome P450 BM-3 for Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 5735–5739. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5735-5739.2001>.
- [52] P. Somu, S. Narayanasamy, L.A. Gomez, S. Rajendran, Y.R. Lee, D. Balakrishnan, Immobilization of enzymes for bioremediation: A future remedial and mitigating strategy, Environ. Res. 212 (2022) 113411. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113411>.
- [53] Z. Bayat, M. Hassanshahian, S. Cappello, Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments: A Mini Review., Open Microbiol. J. 9 (2015) 48–54. <https://doi.org/10.2174/1874285801509010048>.
- [54] E.M. Ostrem Loss, M.-K. Lee, M.-Y. Wu, J. Martien, Utilization of Benzo [a] Pyrene by Aspergillus Species, Mol. Biol. Physiol. 10 (2019) 1–15.
- [55] R. Srivastav, R. Sharma, S. Tandon, C. Tandon, Role of DHH superfamily proteins in nucleic acids metabolism and stress tolerance in prokaryotes and eukaryotes, Int. J. Biol. Macromol. 127 (2019) 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.123>.
- [56] E.M. Ostrem Loss, J.H. Yu, Bioremediation and microbial metabolism of benzo(a)pyrene, Mol. Microbiol. 109 (2018) 433–444. <https://doi.org/10.1111/mmi.14062>.
- [57] S. Wang, X. Li, W. Liu, P. Li, L. Kong, W. Ren, H. Wu, Y. Tu, Degradation of pyrene by immobilized microorganisms in saline-alkaline soil, J. Environ. Sci. (China). 24 (2012) 1662–1669. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60963-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60963-7).
- [58] G. yaohua, X. ping, J. feng, S. keren, Co-immobilization of laccase and ABTS onto novel dual-functionalized cellulose beads for highly improved biodegradation of indole, J. Hazard. Mater. 365 (2019) 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.076>.
- [59] L.A. Ee, H. Zhao, J.P. Obbard, Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering, Enzyme Microb. Technol. 37 (2005) 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.07.024>.
- [60] S. Lang, Biological amphiphiles (microbial biosurfactants), Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 7 (2002) 12–20. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00007-9).
- [61] C. Calvo, M. Manzanera, G.A. Silva-Castro, I. Uad, J. González-López, Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects, Sci. Total Environ. 407 (2009) 3634–3640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.008>.

- [62] J. Sharma, D. Sundar, P. Srivastava, Biosurfactants: Potential Agents for Controlling Cellular Communication, Motility, and Antagonism, *Front. Mol. Biosci.* 8 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.727070>.
- [63] L.A. Sarubbo, M. da G.C. Silva, I.J.B. Durval, K.G.O. Bezerra, B.G. Ribeiro, I.A. Silva, M.S. Twigg, I.M. Banat, Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives, *Biochem. Eng. J.* 181 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>.
- [64] S.S. Mohanty, Y. Koul, S. Varjani, A. Pandey, H.H. Ngo, J.S. Chang, J.W.C. Wong, X.T. Bui, A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production, *Microb. Cell Fact.* 20 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>.
- [65] J.D. Desai, I.M. Banat, Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 47–64. <https://doi.org/10.1128/membr.61.1.47-64.1997>.
- [66] B. Wu, J. Xiu, L. Yu, L. Huang, L. Yi, Y. Ma, Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* SL and its potential for enhanced oil recovery in low permeability reservoirs, *Sci. Rep.* 12 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12025-7>.
- [67] Z.W. Xia, J.G. Zhang, Z.J. Ni, F. Zhang, K. Thakur, F. Hu, Z.J. Wei, Functional and emulsification characteristics of phospholipids and derived o/w emulsions from peony seed meal, *Food Chem.* 389 (2022) 133112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133112>.
- [68] N. Mazzella, A.D. Syakti, J. Molinet, M. Gilewicz, P. Doumenq, J. Artaud, J.C. Bertrand, Effects of crude oil on phospholipid fatty acid compositions of marine hydrocarbon degraders: Estimation of the bacterial membrane fluidity, *Environ. Res.* 97 (2005) 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.06.007>.
- [69] G.M. Aleid, A.S. Alshammari, D.B. Tripathy, A. Gupta, S. Ahmad, Polymeric Surfactants: Recent Advancement in Their Synthesis, Properties, and Industrial Applications, *Macromol. Chem. Phys.* 224 (2023) 1–21. <https://doi.org/10.1002/macp.202300107>.
- [70] A. Kashif, R. Rehman, A. Fuwad, M.K. Shahid, H.N.P. Dayarathne, A. Jamal, M.N. Aftab, B. Mainali, Y. Choi, Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 306 (2022) 102718. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102718>.
- [71] M. Blum, M. Werchow, I. Gelernter, Effect of oral contraception by progesterone pill on lipids and glucose metabolism., *Adv. Contracept. Deliv. Syst.* 4 (1983) 55–59.
- [72] L.M. Whang, P.W.G. Liu, C.C. Ma, S.S. Cheng, Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil, *J. Hazard. Mater.* 151 (2008) 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.063>.

- [73] R.M. Maier, G. Soberón-Chávez, *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: Biosynthesis and potential applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (2000) 625–633. <https://doi.org/10.1007/s002530000443>.
- [74] A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, T.J.P. Smyth, I.M. Banat, Production and applications of trehalose lipid biosurfactants, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 617–627. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900162>.
- [75] G. Odukkathil, N. Vasudevan, Enhanced biodegradation of endosulfan and its major metabolite endosulfate by a biosurfactant producing bacterium, *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes.* 48 (2013) 462–469. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.761873>.
- [76] K. Arima, A. Kakinuma, G. Tamura, Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31 (1968) 488–494. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90503-2).
- [77] C.P. Thomas, M.L. Duvall, E.P. Robertson, K.B. Barrett, G.A. Bala, Surfactant-based EOR mediated by naturally occurring microorganisms, *SPE Reserv. Eng. (Society Pet. Eng.* 8 (1993) 285–291. <https://doi.org/10.2118/22844-PA>.
- [78] J.J. Hong, S.M. Yang, C.H. Lee, Y.K. Choi, T. Kajiuchi, Ultrafiltration of divalent metal cations from aqueous solution using polycarboxylic acid type biosurfactant, *J. Colloid Interface Sci.* 202 (1998) 63–73. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5446>.
- [79] V.D. Appanna, H. Finn, M.S. Pierre, Exocellular phosphatidylethanolamine production and multiple-metal tolerance in *Pseudomonas fluorescens*, *FEMS Microbiol. Lett.* 131 (1995) 53–56. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00234-V](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00234-V).
- [80] Z. Zosim, D. Gutnick, E. Rosenberg, Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan, *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 281–292. <https://doi.org/10.1002/bit.260240203>.
- [81] A. Toren, S. Navon-Venezia, E.Z. Ron, E. Rosenberg, Emulsifying Activities of Purified Alasane Proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 1102–1106. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1102-1106.2001>.
- [82] M.C. Cirigliano, G.M. Carman, Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 846–850. <https://doi.org/10.1128/aem.50.4.846-850.1985>.
- [83] C.N. Mulligan, Environmental applications for biosurfactants, *Environ. Pollut.* 133 (2005) 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>.
- [84] H.S. El-Sheshtawy, M.M. Doheim, Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity, *Egypt. J. Pet.* 23 (2014) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2014.02.001>.
- [85] D.W.G. Develter, L.M.L. Lauryssen, Properties and industrial applications of sophorolipids, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 628–638.

<https://doi.org/10.1002/ejlt.200900153>.

- [86] E.J. Gudiña, E.C. Fernandes, A.I. Rodrigues, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00059>.
- [87] R. Jahan, A.M. Bodratti, M. Tsianou, P. Alexandridis, Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 275 (2020) 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>.
- [88] T.M.S. Lima, L.C. Procópio, F.D. Brandão, B.A. Leão, M.R. Tótola, A.C. Borges, Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 2957–2964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.109>.
- [89] I.A. Purwasena, D.I. Astuti, M. Syukron, M. Amaniyah, Y. Sugai, Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR, *J. Pet. Sci. Eng.* 183 (2019) 106383. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.106383>.
- [90] A.M. Elazzazy, T.S. Abdelmoneim, O.A. Almaghrabi, Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia, *Saudi J. Biol. Sci.* 22 (2015) 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.018>.
- [91] P.K. Mohan, G. Nakhla, E.K. Yanful, Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions, *Water Res.* 40 (2006) 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.030>.
- [92] X. PEI, X. ZHAN, L. ZHOU, Effect of biosurfactant on the sorption of phenanthrene onto original and H₂O₂-treated soils, *J. Environ. Sci.* 21 (2009) 1378–1385. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62429-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62429-8).
- [93] T.M.S. Lima, L.C. Procópio, F.D. Brandão, A.M.X. Carvalho, M.R. Tótola, A.C. Borges, Biodegradability of bacterial surfactants, *Biodegradation.* 22 (2011) 585–592. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9431-3>.
- [94] G.P. Voulgaridou, T. Mantso, I. Anestopoulos, A. Klavaris, C. Katzastra, D.E. Kiousi, M. Mantela, A. Galanis, K. Gardikis, I.M. Banat, T. Gutierrez, K. Sałek, S. Euston, M.I. Panayiotidis, A. Pappa, Toxicity profiling of biosurfactants produced by novel marine bacterial strains, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22052383>.
- [95] R. Patowary, K. Patowary, M.C. Kalita, S. Deka, Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 129 (2018) 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.01.004>.
- [96] H. Zhou, X. Huang, Y. Liang, Y. Li, Q. Xie, C. Zhang, S. You, Enhanced bioremediation of hydraulic fracturing flowback and produced water using an

- indigenous biosurfactant-producing bacteria *Acinetobacter* sp. Y2, *Chem. Eng. J.* 397 (2020) 125348. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125348>.
- [97] Swati, M. Kumari, P. Ghosh, I.S. Thakur, Evaluation of a biosurfactant producing bacterial strain *Pseudomonas* sp. ISTPY2 for efficient pyrene degradation and landfill soil bioremediation through soil microcosm and proteomic studies, *Bioresour. Technol. Reports.* 12 (2020) 100607. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100607>.
- [98] W. Sun, B. Zhu, F. Yang, M. Dai, S. Sehar, C. Peng, I. Ali, I. Naz, Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas* sp. CQ2 and its application for remediation of heavy metal contaminated soil, *Chemosphere.* 265 (2021) 129090. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129090>.
- [99] T.R. Bjerk, P. Severino, S. Jain, C. Marques, A.M. Silva, T. Pashirova, E.B. Souto, Biosurfactants: Properties and applications in drug delivery, biotechnology and ecotoxicology, *Bioengineering.* 8 (2021) 1–18. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8080115>.
- [100] M. Ohadi, H. Forootanfar, G. Dehghannoudeh, T. Eslaminejad, A. Ameri, M. Shakibaie, M. Adeli-Sardou, Antimicrobial, anti-biofilm, and anti-proliferative activities of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6, *Microb. Pathog.* 138 (2020) 103806. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103806>.
- [101] N. de Andrade Teixeira Fernandes, A.C. de Souza, L.A. Simões, G.M. Ferreira dos Reis, K.T. Souza, R.F. Schwan, D.R. Dias, Eco-friendly biosurfactant from *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 as larvicidal and antimicrobial, *Microbiol. Res.* 241 (2020) 126571. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126571>.
- [102] L. Sandeep, Biosurfactant: Pharmaceutical Perspective, *J. Anal. Pharm. Res.* 4 (2017). <https://doi.org/10.15406/japlr.2017.04.00105>.
- [103] A. Ferreira, X. Vecino, D. Ferreira, J.M. Cruz, A.B. Moldes, L.R. Rodrigues, Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 155 (2017) 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.026>.
- [104] S.A. Adu, P.J. Naughton, R. Marchant, I.M. Banat, Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations, *Pharmaceutics.* 12 (2020) 1–21. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111099>.
- [105] F. Shahaliyan, A. Safahieh, H. Abyar, Evaluation of Emulsification Index in Marine Bacteria *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp., *Arab. J. Sci. Eng.* 40 (2015) 1849–1854. <https://doi.org/10.1007/s13369-015-1663-4>.
- [106] R. Cerón-Camacho, R. Martínez-Palou, B. Chávez-Gómez, F. Cuéllar, C. Bernal-Huicochea, J. De-la-Cruz Clavel, J. Aburto, Synergistic effect of alkyl-O-glucoside and -cellobioside biosurfactants as effective emulsifiers of crude oil in water. A proposal for the transport of heavy crude oil by pipeline, *Fuel.* 110 (2013) 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.11.023>.

- [107] R. de C.F.S. Silva, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 12523–12542. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>.
- [108] E.E. Okoro, E.A. Ewarezi, S.E. Sanni, T. Ojo, M.E. Emetere, J.O. Omodara, Microbial Enhanced Oil Recovery using Biosurfactant produced with Hyperthermophiles isolated from Subsurface Sandstone Reservoir, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 665 (2021). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/665/1/012062>.
- [109] B.E. Logan, Microbial Fuel Cells, *Microb. Fuel Cells.* (2008) 1–200. <https://doi.org/10.1002/9780470258590>.
- [110] B.E. Logan, Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 375–381.
- [111] N. Wang, M. Gao, S. Liu, W. Zhu, Y. Zhang, X. Wang, H. Sun, Y. Guo, Q. Wang, Electrochemical promotion of organic waste fermentation: Research advances and prospects, *Environ. Res.* 244 (2024) 117422. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117422>.
- [112] G. Pasternak, A. de Rosset, P. Rutkowski, Horizontal microbial fuel cell system producing biosurfactants in response to current generation from waste cooking oil as a fuel, *Energy Convers. Manag.* 281 (2023) 116807. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2023.116807>.
- [113] L.F. Leon-Fernandez, J. Villaseñor, L. Rodriguez, P. Cañizares, M.A. Rodrigo, F.J. Fernández-Morales, Dehalogenation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid by means of bioelectrochemical systems, *J. Electroanal. Chem.* 854 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113564>.
- [114] G. Beretta, M. Daghighi, A.E. Tofalos, A. Franzetti, A.F. Mastorgio, S. Saponaro, E. Sezenna, Progress towards bioelectrochemical remediation of Hexavalent Chromium, *Water (Switzerland)*. 11 (2019) 1–21. <https://doi.org/10.3390/w11112336>.
- [115] O. Choi, B.I. Sang, Extracellular electron transfer from cathode to microbes: Application for biofuel production, *Biotechnol. Biofuels.* 9 (2016) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0426-0>.
- [116] F. Enzmann, F. Mayer, D. Holtmann, Process parameters influence the extracellular electron transfer mechanism in bioelectromethanogenesis, *Int. J. Hydrogen Energy.* 44 (2019) 24450–24458. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.039>.
- [117] M. Ding, H.Y. Shiu, S.L. Li, C.K. Lee, G. Wang, H. Wu, N.O. Weiss, T.D. Young, P.S. Weiss, G.C.L. Wong, K.H. Nealson, Y. Huang, X. Duan, Nanoelectronic Investigation Reveals the Electrochemical Basis of Electrical Conductivity in *Shewanella* and *Geobacter*, *ACS Nano.* 10 (2016) 9919–9926. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03655>.
- [118] K.S. Aiyer, How does electron transfer occur in microbial fuel cells?, *World J.*

- Microbiol. Biotechnol. 36 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2801-z>.
- [119] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, Microbial fuel cells: Methodology and technology, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5181–5192. <https://doi.org/10.1021/es0605016>.
 - [120] S.P.K. Essuman, A. Nyamful, V. Agbodemegbe, S.K. Debrah, Experimental Studies of the Effect of Electrolyte Strength, Voltage and Time on the Production of Brown's (HHO) Gas Using Oxyhydrogen Generator, *Open J. Energy Effic.* 08 (2019) 64–80. <https://doi.org/10.4236/ojee.2019.82005>.
 - [121] A.P. Borole, D. Aaron, C.Y. Hamilton, C. Tsouris, Understanding long-term changes in microbial fuel cell performance using electrochemical impedance spectroscopy, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 2740–2745. <https://doi.org/10.1021/es9032937>.
 - [122] P. Clauwaert, P. Aelterman, T.H. Pham, L. De Schamphelaire, M. Carballa, K. Rabaey, W. Verstraete, Minimizing losses in bio-electrochemical systems: The road to applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2008) 901–913. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1522-2>.
 - [123] B.A. Mei, O. Munteshari, J. Lau, B. Dunn, L. Pilon, Physical Interpretations of Nyquist Plots for EDLC Electrodes and Devices, *J. Phys. Chem. C.* 122 (2018) 194–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b10582>.
 - [124] X. Zhu, J.C. Tokash, Y. Hong, B.E. Logan, Controlling the occurrence of power overshoot by adapting microbial fuel cells to high anode potentials, *Bioelectrochemistry.* 90 (2013) 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.10.004>.
 - [125] H. Rismani-Yazdi, S.M. Carver, A.D. Christy, Z. Yu, K. Bibby, J. Peccia, O.H. Tuovinen, Suppression of methanogenesis in cellulose-fed microbial fuel cells in relation to performance, metabolite formation, and microbial population, *Bioresour. Technol.* 129 (2013) 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.137>.
 - [126] G. Pasternak, A. de Rosset, N. Tyszkiewicz, B. Widera, J. Greenman, I. Ieropoulos, Prevention and removal of membrane and separator biofouling in bioelectrochemical systems: a comprehensive review, *IScience.* 25 (2022) 104510. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104510>.
 - [127] K. Rabaey, P. Girguis, L.K. Nielsen, Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (2011) 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.010>.
 - [128] P.D. Kiely, J.M. Regan, B.E. Logan, The electric picnic: Synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (2011) 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.003>.
 - [129] B.E. Logan, D. Call, S. Cheng, H.V.M. Hamelers, T.H.J.A. Sleutels, A.W. Jeremiasse,

- R.A. Rozendal, Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8630–8640. <https://doi.org/10.1021/es801553z>.
- [130] T.H.J. a Sleutels, A. Ter Heijne, C.J.N. Buisman, H.V.M. Hamelers, Bioelectrochemical systems: An outlook for practical applications, *ChemSusChem*. 5 (2012) 1012–1019. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100732>.
- [131] Y. Koul, V. Devda, S. Varjani, W. Guo, H.H. Ngo, M.J. Taherzadeh, J.S. Chang, J.W.C. Wong, M. Bilal, S.H. Kim, X.T. Bui, R. Parra-Saldivar, Microbial electrolysis: a promising approach for treatment and resource recovery from industrial wastewater, *Bioengineered*. 13 (2022) 8115–8134. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2051842>.
- [132] T.G. Ambaye, A. Chebbi, F. Formicola, A. Rosatelli, S. Prasad, F.H. Gomez, S. Scaffoni, A. Franzetti, M. Vaccari, Ex-situ bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil using mixed stimulants: Response and dynamics of bacterial community and phytotoxicity, *J. Environ. Chem. Eng.* 10 (2022) 108814. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108814>.
- [133] J. Chen, Q. Yang, T. Huang, Y. Zhang, R. Ding, Enhanced bioremediation of soil contaminated with viscous oil through microbial consortium construction and ultraviolet mutation, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (2011) 1381–1389. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0589-y>.
- [134] P. Fatehbasharad, S. Aliasghari, I. Shaterzadeh Tabrizi, J.A. Khan, G. Boczkaj, Microbial fuel cell applications for removal of petroleum hydrocarbon pollutants: A review, *Water Resour. Ind.* 28 (2022) 100178. <https://doi.org/10.1016/j.wri.2022.100178>.
- [135] H. Liang, J. Han, X. Yang, Z. Qiao, T. Yin, Performance improvement of microbial fuel cells through assembling anodes modified with nanoscale materials, *Nanomater. Nanotechnol.* 12 (2022) 1–14. <https://doi.org/10.1177/18479804221132965>.
- [136] H. Wang, L. Xing, H. Zhang, C. Gui, S. Jin, H. Lin, Q. Li, C. Cheng, Key factors to enhance soil remediation by bioelectrochemical systems (BESs): A review, *Chem. Eng. J.* 419 (2021) 129600. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129600>.
- [137] M. Tucci, C. Cruz, A. Esteve, A. Schievano, K. Rabaey, F. Aulenta, Empowering electroactive microorganisms for soil remediation: Challenges in the bioelectrochemical removal of petroleum hydrocarbons, *Chem. Eng. J.* 419 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130008>.
- [138] K. Herkendell, Status update on bioelectrochemical systems: Prospects for carbon electrode design and scale-up, *Catalysts*. 11 (2021) 1–18. <https://doi.org/10.3390/catal11020278>.
- [139] M.T. Noori, M.M. Ghangrekar, C.K. Mukherjee, B. Min, Biofouling effects on the performance of microbial fuel cells and recent advances in biotechnological and chemical strategies for mitigation, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 107420. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107420>.

- [140] A. Baudler, I. Schmidt, M. Langner, A. Greiner, U. Schröder, Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems, *Energy Environ. Sci.* 8 (2015) 2048–2055. <https://doi.org/10.1039/c5ee00866b>.
- [141] W. Chen, Z. Liu, Y. Li, K. Jiang, J. Hou, X. Lou, X. Xing, Q. Liao, X. Zhu, A novel stainless steel fiber felt/Pd nanocatalysts electrode for efficient ORR in air-cathode microbial fuel cells, *Electrochim. Acta.* 324 (2019) 134862. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.134862>.
- [142] D. Pocaznoi, A. Calmet, L. Etcheverry, B. Erable, A. Bergel, Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells, *Energy Environ. Sci.* 5 (2012) 9645–9652. <https://doi.org/10.1039/c2ee22429a>.
- [143] M. Shabani, H. Younesi, M. Pontié, A. Rahimpour, M. Rahimnejad, A.A. Zinatizadeh, A critical review on recent proton exchange membranes applied in microbial fuel cells for renewable energy recovery, *J. Clean. Prod.* 264 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121446>.
- [144] S.B. Pasupuleti, S. Srikanth, X. Dominguez-Benetton, S.V. Mohan, D. Pant, Dual gas diffusion cathode design for microbial fuel cell (MFC): Optimizing the suitable mode of operation in terms of bioelectrochemical and bioelectro-kinetic evaluation, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 624–639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4613>.
- [145] J.X. Leong, W.R.W. Daud, M. Ghasemi, K. Ben Liew, M. Ismail, Ion exchange membranes as separators in microbial fuel cells for bioenergy conversion: A comprehensive review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 28 (2013) 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.052>.
- [146] G. Pasternak, N. Ormeno-Cano, P. Rutkowski, Recycled waste polypropylene composite ceramic membranes for extended lifetime of microbial fuel cells, *Chem. Eng. J.* (2021) 130707. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2021.130707>.
- [147] P. Bakonyi, L. Koók, G. Kumar, G. Tóth, T. Rózsenszki, D.D. Nguyen, S.W. Chang, G. Zhen, K. Béla-Bakó, N. Nemestóthy, Architectural engineering of bioelectrochemical systems from the perspective of polymeric membrane separators: A comprehensive update on recent progress and future prospects, *J. Memb. Sci.* 564 (2018) 508–522. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.07.051>.
- [148] G. Pasternak, Y. Yang, B.B. Santos, F. Brunello, M.M. Hanczyc, A. Motta, Regenerated silk fibroin membranes as separators for transparent microbial fuel cells, *Bioelectrochemistry.* 126 (2019) 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.12.004>.
- [149] A.S. Mathuriya, D. Pant, Assessment of expanded polystyrene as a separator in microbial fuel cell, *Environ. Technol.* 40 (2019) 2052–2061. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1435740>.
- [150] Y.C. Liu, L.Z. Li, Y. Wu, W. Tian, L.P. Zhang, L. Xu, Q.R. Shen, B. Shen, Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the *alkB* gene, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 310–316.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.028>.

- [151] H. Hassan, B. Jin, S. Dai, T. Ma, C. Saint, Chemical impact of catholytes on *Bacillus subtilis*-catalysed microbial fuel cell performance for degrading 2,4-dichlorophenol, *Chem. Eng. J.* 301 (2016) 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.077>.
- [152] G. Palanisamy, H.Y. Jung, T. Sadhasivam, M.D. Kurkuri, S.C. Kim, S.H. Roh, A comprehensive review on microbial fuel cell technologies: Processes, utilization, and advanced developments in electrodes and membranes, *J. Clean. Prod.* 221 (2019) 598–621. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.172>.
- [153] P.F. Tee, M.O. Abdullah, I.A.W. Tan, M.A.M. Amin, C. Nolasco-Hipolito, K. Bujang, Bio-energy generation in an affordable, single-chamber microbial fuel cell integrated with adsorption hybrid system: effects of temperature and comparison study, *Environ. Technol. (United Kingdom)*. 39 (2018) 1081–1088. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1320433>.
- [154] O. Adelaja, T. Keshavarz, G. Kyazze, The effect of salinity, redox mediators and temperature on anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in microbial fuel cells, *J. Hazard. Mater.* 283 (2015) 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.066>.
- [155] X. Guo, Y. Zhan, C. Chen, B. Cai, Y. Wang, S. Guo, Influence of packing material characteristics on the performance of microbial fuel cells using petroleum refinery wastewater as fuel, *Renew. Energy*. 87 (2016) 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.10.041>.
- [156] G. Pasternak, T.D. Askitosari, M.A. Rosenbaum, Biosurfactants and Synthetic Surfactants in Bioelectrochemical Systems: A Mini-Review, *Front. Microbiol.* 11 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00358>.
- [157] Q. Wen, F. Kong, F. Ma, Y. Ren, Z. Pan, Improved performance of air-cathode microbial fuel cell through additional Tween 80, *J. Power Sources*. 196 (2011) 899–904. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2010.09.009>.
- [158] H.B. Shen, X.Y. Yong, Y.L. Chen, Z.H. Liao, R.W. Si, J. Zhou, S.Y. Wang, Y.C. Yong, P.K. OuYang, T. Zheng, Enhanced bioelectricity generation by improving pyocyanin production and membrane permeability through sophorolipid addition in *pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 167 (2014) 490–494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.093>.
- [159] T. Zheng, Y.S. Xu, X.Y. Yong, B. Li, D. Yin, Q.W. Cheng, H.R. Yuan, Y.C. Yong, Endogenously enhanced biosurfactant production promotes electricity generation from microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 197 (2015) 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.136>.
- [160] Y. Zhang, J. Jiang, Q. Zhao, Y.Z. Gao, K. Wang, J. Ding, H. Yu, Y. Yao, Accelerating anodic biofilms formation and electron transfer in microbial fuel cells: Role of anionic biosurfactants and mechanism, *Bioelectrochemistry*. 117 (2017) 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.06.002>.

- [161] J.M. Morris, S. Jin, B. Crimi, A. Pruden, Microbial fuel cell in enhancing anaerobic biodegradation of diesel, *Chem. Eng. J.* 146 (2009) 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.05.028>.
- [162] E. Gambino, M. Toscanesi, F. Del Prete, F. Flagiello, G. Falcucci, M. Minutillo, M. Trifuoggi, M. Guida, R.A. Nastro, E. Jannelli, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Degradation and Detoxification of Water Environment in Single-chamber Air-cathode Microbial Fuel Cells (MFCs), *Fuel Cells*. 17 (2017) 618–626. <https://doi.org/10.1002/fuce.201700124>.
- [163] X. Wang, Z. Cai, Q. Zhou, Z. Zhang, C. Chen, Bioelectrochemical stimulation of petroleum hydrocarbon degradation in saline soil using U-tube microbial fuel cells, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 426–433. <https://doi.org/10.1002/bit.23351>.
- [164] L. Lu, H. Yazdi, S. Jin, Y. Zuo, P.H. Fallgren, Z.J. Ren, Enhanced bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil using pilot-scale bioelectrochemical systems, *J. Hazard. Mater.* 274 (2014) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.060>.
- [165] X. Li, X. Wang, L. Wan, Y. Zhang, N. Li, D. Li, Q. Zhou, Enhanced biodegradation of aged petroleum hydrocarbons in soils by glucose addition in microbial fuel cells, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 267–275. <https://doi.org/10.1002/jctb.4660>.
- [166] Y. Zhao, Y. Sun, H. Sun, F. Zuo, S. Kuang, S. Zhang, F. Wang, Surfactant-Based Chemical Washing to Remediate Oil-Contaminated Soil: The State of Knowledge, *Toxics*. 12 (2024) 648. <https://doi.org/10.3390/toxics12090648>.
- [167] X. Li, X. Wang, Z.J. Ren, Y. Zhang, N. Li, Q. Zhou, Sand amendment enhances bioelectrochemical remediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil, *Chemosphere*. 141 (2015) 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.025>.
- [168] X. Li, X. Wang, Y. Zhang, Q. Zhao, B. Yu, Y. Li, Q. Zhou, Salinity and Conductivity Amendment of Soil Enhanced the Bioelectrochemical Degradation of Petroleum Hydrocarbons, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep32861>.
- [169] Y. Zhang, X. Wang, X. Li, L. Cheng, L. Wan, Q. Zhou, Horizontal arrangement of anodes of microbial fuel cells enhances remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 2335–2341. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3539-7>.
- [170] H. Wang, H. Wang, C. Gao, L. Liu, Enhanced removal of copper by electroflocculation and electroreduction in a novel bioelectrochemical system assisted microelectrolysis, *Bioresour. Technol.* 297 (2020) 122507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122507>.
- [171] B. Zhang, C. Feng, J. Ni, J. Zhang, W. Huang, Simultaneous reduction of vanadium (V) and chromium (VI) with enhanced energy recovery based on microbial fuel cell technology, *J. Power Sources*. 204 (2012) 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.01.013>.

- [172] L. Szydlowski, J. Ehlich, I. Goryanin, G. Pasternak, High-throughput 96-well bioelectrochemical platform for screening of electroactive microbial consortia, *Chem. Eng. J.* 427 (2022) 131692. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131692>.
- [173] P. Kuntke, K.M. Śmiech, H. Bruning, G. Zeeman, M. Saakes, T.H.J.A. Sleutels, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Ammonium recovery and energy production from urine by a microbial fuel cell, *Water Res.* 46 (2012) 2627–2636. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.025>.
- [174] P. Ledezma, P. Kuntke, C.J.N. Buisman, J. Keller, S. Freguia, Source-separated urine opens golden opportunities for microbial electrochemical technologies, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.01.007>.
- [175] N. Sekar, R.P. Ramasamy, Electrochemical impedance spectroscopy for microbial fuel cell characterization, *J. Microb. Biochem. Technol.* 5 (2013). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.s6-004>.
- [176] P. Mani, V.T. Fidal, K. Bowman, T.S. Chandra, T. Keshavarz, G. Kyazze, Development of an electroactive aerobic biocathode for microbial fuel cell applications, *Environ. Microbiol. Rep.* 12 (2020) 607–612. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12871>.
- [177] C.M. Reddy, J.G. Quinn, GC-MS analysis of total petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater samples after the North Cape oil spill, *Mar. Pollut. Bull.* 38 (1999) 126–135. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00106-4).
- [178] A.T. Roman-Hubers, T.J. McDonald, E.S. Baker, W.A. Chiu, I. Rusyn, A Comparative Analysis of Analytical Techniques for Rapid Oil Spill Identification, *Environ. Toxicol. Chem.* 40 (2021) 1034–1049. <https://doi.org/10.1002/etc.4961>.
- [179] K.R. Rosalin Hongsthavij1, Yosvimol Kuphasuk1, Effectiveness of platelet-rich fibrin in the management of pain and delayed wound healing, *Eur. J. Dent.* 11 (2017) 192–195. <https://doi.org/10.4103/ejd.ejd>.
- [180] A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn, F.O. Glöckner, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- [181] E. Bolyen, J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C. Abnet, G.A. Al-Ghalith, H. Alexander, E.J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J.E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C.J. Brislawn, C.T. Brown, B.J. Callahan, A.M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E.K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P.C. Dorrestein, G.M. Douglas, D.M. Durall, C. Duvallet, C.F. Edwards, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J.M. Gauglitz, S.M. Gibbons, D.L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G.A. Huttley, S. Janssen, A.K. Jarmusch, L. Jiang, B.D. Kaehler, K. Bin Kang, C.R. Keefe, P. Keim, S.T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciolk, J. Kreps, M.G.I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y.X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B.D. Martin, D. McDonald, L.J. McIver, A. V. Melnik, J.L.

- Metcalf, S.C. Morgan, J.T. Morton, A.T. Naimey, J.A. Navas-Molina, L.F. Nothias, S.B. Orchanian, T. Pearson, S.L. Peoples, D. Petras, M.L. Preuss, E. Pruesse, L.B. Rasmussen, A. Rivers, M.S. Robeson, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S.J. Song, J.R. Spear, A.D. Swafford, L.R. Thompson, P.J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P.J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J.J.J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K.C. Weber, C.H.D. Williamson, A.D. Willis, Z.Z. Xu, J.R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight, J.G. Caporaso, Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2, *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- [182] B.J. Callahan, P.J. McMurdie, M.J. Rosen, A.W. Han, A.J.A. Johnson, S.P. Holmes, DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nat. Methods.* 13 (2016) 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- [183] T. Rognes, T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, F. Mahé, VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics, *PeerJ.* 2016 (2016) 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>.
- [184] N.A. Bokulich, B.D. Kaehler, J.R. Rideout, M. Dillon, E. Bolyen, R. Knight, G.A. Huttley, J. Gregory Caporaso, Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin, *Microbiome.* 6 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>.
- [185] G. Pasternak, B. Kołwzan, Surface tension and toxicity changes during biodegradation of carbazole by newly isolated methylotrophic strain *Methylobacterium* sp. GPE1, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 84 (2013) 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.021>.
- [186] X. Ying, K. Guo, W. Chen, Y. Gu, D. Shen, Y. Zhou, Y. Liang, Y. Wang, M. Wang, H. Feng, The impact of electron donors and anode potentials on the anode-respiring bacteria community, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 7997–8005. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8518-8>.
- [187] Y.H. Hong, C.C. Ye, Q.Z. Zhou, X.Y. Wu, J.P. Yuan, J. Peng, H. Deng, J.H. Wang, Genome sequencing reveals the potential of *Achromobacter* sp. HZ01 for bioremediation, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01507>.
- [188] K. Sathish-Kumar, O. Solorza-Feria, J. Tapia-Ramírez, N. Rinderknecht-Seijas, H.M. Poggi-Varaldo, Electrochemical and chemical enrichment methods of a sodic-saline inoculum for microbial fuel cells, *Int. J. Hydrogen Energy.* 38 (2013) 12600–12609. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.147>.
- [189] S. Parot, M.L. Délia, A. Bergel, Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 4809–4816. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.047>.
- [190] C.I. Torres, R. Krajmalnik-Brown, P. Parameswaran, A.K. Marcus, G. Wanger, Y.A. Gorby, B.E. Rittmann, Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential: Phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization,

- Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 9519–9524. <https://doi.org/10.1021/es902165y>.
- [191] L. Zhou, D. Deng, D. Zhang, Q. Chen, J. Kang, N. Fan, Y. Liu, Microbial Electricity Generation and Isolation of Exoelectrogenic Bacteria Based on Petroleum Hydrocarbon-contaminated Soil, *Electroanalysis*. 28 (2016) 1510–1516. <https://doi.org/10.1002/elan.201501052>.
- [192] B. Erable, M.A. Roncato, W. Achouak, A. Bergel, Sampling natural biofilms: A new route to build efficient microbial anodes, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3194–3199. <https://doi.org/10.1021/es803549v>.
- [193] E. Palma, A. Espinoza Tofalos, M. Daghighi, A. Franzetti, P. Tsiota, C. Cruz Viggi, M.P. Papini, F. Aulenta, Bioelectrochemical treatment of groundwater containing BTEX in a continuous-flow system: Substrate interactions, microbial community analysis, and impact of sulfate as a co-contaminant, *N. Biotechnol.* 53 (2019) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.06.004>.
- [194] E. Palma, M. Daghighi, A. Franzetti, M. Petrangeli Papini, F. Aulenta, The bioelectric well: a novel approach for in situ treatment of hydrocarbon-contaminated groundwater, *Microb. Biotechnol.* 11 (2018) 112–118. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12760>.
- [195] I. Ieropoulos, J. Winfield, J. Greenman, Effects of flow-rate, inoculum and time on the internal resistance of microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3520–3525. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.108>.
- [196] J. Winfield, I. Ieropoulos, J. Greenman, J. Dennis, The overshoot phenomenon as a function of internal resistance in microbial fuel cells, *Bioelectrochemistry*. 81 (2011) 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.01.001>.
- [197] A. de Rosset, P. Rutkowski, G. Pasternak, The effect of surface and porous structure on long-term performance of carbon powder cathodes without binder, during a 300-day trial in microbial fuel cells, *Sustain. Energy Technol. Assessments*. 58 (2023) 103340. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2023.103340>.
- [198] A. Kumar, L.H.H. Hsu, P. Kavanagh, F. Barrière, P.N.L. Lens, L. Lapinsonnière, J.H. Lienhard, U. Schröder, X. Jiang, D. Leech, The ins and outs of microorganism-electrode electron transfer reactions, *Nat. Rev. Chem.* 1 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0024>.
- [199] G. Pasternak, J. Greenman, I. Ieropoulos, Dynamic evolution of anodic biofilm when maturing under different external resistive loads in microbial fuel cells. Electrochemical perspective, *J. Power Sources*. 400 (2018) 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.08.031>.
- [200] S. Srikanth, E. Marsili, M.C. Flickinger, D.R. Bond, Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008) 1065–1073. <https://doi.org/10.1002/bit.21671>.
- [201] R. Wang, H. Li, J. Sun, L. Zhang, J. Jiao, Q. Wang, S. Liu, Nanomaterials Facilitating Microbial Extracellular Electron Transfer at Interfaces, *Adv. Mater.* 33 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.1002/adma.202004051>.

- [202] F. Kracke, I. Vassilev, J.O. Krömer, Microbial electron transport and energy conservation - The foundation for optimizing bioelectrochemical systems, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00575>.
- [203] X. Zhu, M.D. Yates, M.C. Hatzell, H. Ananda Rao, P.E. Saikaly, B.E. Logan, Microbial community composition is unaffected by anode potential, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 1352–1358. <https://doi.org/10.1021/es404690q>.
- [204] R.C. Wagner, D.F. Call, B.E. Logan, Optimal set anode potentials vary in bioelectrochemical systems, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 6036–6041. <https://doi.org/10.1021/es101013e>.
- [205] X. Li, Q. Zhao, X. Wang, Y. Li, Q. Zhou, Surfactants selectively reallocated the bacterial distribution in soil bioelectrochemical remediation of petroleum hydrocarbons, *J. Hazard. Mater.* 344 (2018) 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.050>.
- [206] S. Wang, M. Xu, B. Jin, U.J. Wünsch, Y. Su, Y. Zhang, Electrochemical and microbiological response of exoelectrogenic biofilm to polyethylene microplastics in water, *Water Res.* 211 (2022) 118046. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118046>.
- [207] D. Patel, S.L. Bapodra, D. Madamwar, C. Desai, Electroactive bacterial community augmentation enhances the performance of a pilot scale constructed wetland microbial fuel cell for treatment of textile dye wastewater, *Bioresour. Technol.* 332 (2021) 125088. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125088>.
- [208] M.T. Bidja Abena, G. Chen, Z. Chen, X. Zheng, S. Li, T. Li, W. Zhong, Microbial diversity changes and enrichment of potential petroleum hydrocarbon degraders in crude oil-, diesel-, and gasoline-contaminated soil, *3 Biotech.* 10 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2027-7>.
- [209] A.J.M. Stams, C.M. Plugge, Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 568–577. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2166>.
- [210] I.M. Simeon, A. Weig, R. Freitag, Optimization of soil microbial fuel cell for sustainable bio-electricity production: combined effects of electrode material, electrode spacing, and substrate feeding frequency on power generation and microbial community diversity, *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* 15 (2022) 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02224-9>.
- [211] J. Erben, Z.A. Pinder, M.S. Lüdtkke, S. Kerzenmacher, Local Acidification Limits the Current Production and Biofilm Formation of *Shewanella oneidensis* MR-1 With Electrospun Anodes, *Front. Microbiol.* 12 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660474>.
- [212] E. Kipf, R. Zengerle, J. Gescher, S. Kerzenmacher, How Does the Choice of Anode Material Influence Electrical Performance? A Comparison of Two Microbial Fuel Cell Model Organisms, *ChemElectroChem.* 1 (2014) 1849–1853. <https://doi.org/10.1002/celc.201402036>.

- [213] I. Vázquez, S. Kerzenmacher, Ó. Santiago, Stainless steel wool as novel bioanode for microbial electrolysis cells: A systematic study of materials, *Front. Energy Res.* 11 (2023) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2023.1119090>.
- [214] T. Diefenbach, M. Sumetzberger-Hasinger, V. Braunschmid, H. Konegger, H.J. Heipieper, G.M. Guebitz, M. Lackner, D. Ribitsch, A.P. Loibner, Laccase-mediated degradation of petroleum hydrocarbons in historically contaminated soil, *Chemosphere.* 348 (2023) 140733. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140733>.
- [215] D. Singh Arora, R. Kumar Sharma, Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 1760–1788. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8676-y>.
- [216] S. Rodríguez Couto, J.L. Toca Herrera, Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>.
- [217] K. Rabaey, W. Verstraete, Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.008>.
- [218] Y. Yang, M. Xu, J. Guo, G. Sun, Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems, *Process Biochem.* 47 (2012) 1707–1714. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.032>.
- [219] B.E. Logan, J.M. Regan, Fuel Cells Fuel cells, *Fuel Cells Technol. Fuel Process.* (2006) 1–32. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53563-4.10002-1>.
- [220] A. Koolivand, H. Abtahi, M. Parhamfar, R. Saeedi, F. Coulon, V. Kumar, J. Villaseñor, M. Sartaj, N. Najarian, M. Shahsavari, P. Seyedmoradi, L. Rahimi, F. Bagheri, The effect of petroleum hydrocarbons concentration on competition between oil-degrading bacteria and indigenous compost microorganisms in petroleum sludge bioremediation, *Environ. Technol. Innov.* 26 (2022) 102319. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102319>.
- [221] E. Palma, M. Daghighi, A. Espinoza Tofalos, A. Franzetti, C. Cruz Viggi, S. Fazi, M. Petrangeli Papini, F. Aulenta, Anaerobic electrogenic oxidation of toluene in a continuous-flow bioelectrochemical reactor: Process performance, microbial community analysis, and biodegradation pathways, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 4 (2018) 2136–2145. <https://doi.org/10.1039/c8ew00666k>.
- [222] B. Cercado, N. Byrne, M. Bertrand, D. Pocaznoi, M. Rimboud, W. Achouak, A. Bergel, Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics, *Bioresour. Technol.* 134 (2013) 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.123>.
- [223] F. Harnisch, S. Freguia, A basic tutorial on cyclic voltammetry for the investigation of electroactive microbial biofilms, *Chem. - An Asian J.* 7 (2012) 466–475. <https://doi.org/10.1002/asia.201100740>.
- [224] R. Rousseau, M.L. Délia, A. Bergel, A theoretical model of transient cyclic

- voltammetry for electroactive biofilms, *Energy Environ. Sci.* 7 (2014) 1079–1094. <https://doi.org/10.1039/c3ee42329h>.
- [225] J. Tang, T. Liu, Y. Yuan, L. Zhuang, Effective control of bioelectricity generation from a microbial fuel cell by logical combinations of pH and temperature, *Sci. World J.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/186016>.
- [226] K. Fricke, F. Harnisch, U. Schröder, On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells, *Energy Environ. Sci.* 1 (2008) 144–147. <https://doi.org/10.1039/b802363h>.
- [227] K. Joshi, C.H. Chan, D.R. Bond, *Geobacter sulfurreducens* inner membrane cytochrome CbcBA controls electron transfer and growth yield near the energetic limit of respiration, *Mol. Microbiol.* 116 (2021) 1124–1139. <https://doi.org/10.1111/mmi.14801>.
- [228] M. Karamzadeh, M. Kadivar, P. Mahmoodi, S.S. Asefi, A. Taghipour, Modeling and experimental investigation of the effect of carbon source on the performance of tubular microbial fuel cell, *Sci. Rep.* 13 (2023) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38215-5>.
- [229] S. Mateo, P. Cañizares, M.A. Rodrigo, F.J. Fernandez-Morales, Driving force behind electrochemical performance of microbial fuel cells fed with different substrates, *Chemosphere.* 207 (2018) 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.100>.
- [230] D. Jin, G. Yu, X. Li, T. Li, F. Zhang, S. Tian, Z. Zhou, Z. Ren, One-pot extractive and oxidative desulfurization of fuel with ternary dual-acid deep eutectic solvent, *Fuel.* 329 (2022) 125513. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125513>.
- [231] P. Thanahiranya, P. Charoensuppanimit, A. Sootitawat, A. Arpornwichanop, N. Thongchul, S. Assabumrungrat, Sustainable Process Design of Propionic Acid Production from Glycerol: A Comparative Study of Bio-Based and Petroleum-Based Technologies, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 10 (2022) 14761–14774. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c03761>.
- [232] L. Lu, T. Huggins, S. Jin, Y. Zuo, Z.J. Ren, Microbial metabolism and community structure in response to bioelectrochemically enhanced remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 4021–4029. <https://doi.org/10.1021/es4057906>.
- [233] C.O. Jeon, E.L. Madsen, In situ microbial metabolism of aromatic-hydrocarbon environmental pollutants, *Curr. Opin. Biotechnol.* 24 (2013) 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.001>.
- [234] F. Widdel, R. Rabus, Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 259–276. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00209-3).
- [235] B. Wartell, M. Boufadel, L. Rodriguez-Freire, An effort to understand and improve the anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons: A literature review, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 157 (2021) 105156.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105156>.

- [236] T. Diefenbach, M. Sumetzberger-Hasinger, V. Braunschmid, H. Konegger, H.J. Heipieper, G.M. Guebitz, M. Lackner, D. Ribitsch, A.P. Loibner, Laccase-mediated degradation of petroleum hydrocarbons in historically contaminated soil, *Chemosphere*. 348 (2023) 140733. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140733>.
- [237] C. Nikolova, T. Gutierrez, Biosurfactants and Their Applications in the Oil and Gas Industry: Current State of Knowledge and Future Perspectives, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.626639>.
- [238] J. Ruterling, M. Ilmer, A. Recio, M. Coleman, J. Vykoukal, E. Alt, N. Orleans, Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review Christina, *Nat. Rev Drug Discov.* 5 (2016) 1–8.
- [239] S. Kannan, A. Solomon, G. Krishnamoorthy, M. Marudhamuthu, Liposome encapsulated surfactant abetted copper nanoparticles alleviates biofilm mediated virulence in pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79976-7>.
- [240] P. Greenspan, E.P. Mayer, S.D. Fowler, Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets, *J. Cell Biol.* 100 (1985) 965–973. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>.
- [241] X. Xu, W. Liu, S. Tian, W. Wang, Q. Qi, P. Jiang, X. Gao, F. Li, H. Li, H. Yu, Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>.
- [242] G. Pasternak, J. Greenman, I. Ieropoulos, Dynamic evolution of anodic biofilm when maturing under different external resistive loads in microbial fuel cells. Electrochemical perspective, *J. Power Sources.* 400 (2018) 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.08.031>.
- [243] J. Długosz, A. Piotrowska-Długosz, B. Breza-Boruta, The effect of differences in soil water content on microbial and enzymatic properties across the soil profiles, *Ecohydrol. Hydrobiol.* (2023). <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2023.06.010>.
- [244] B. Widera, N. Tyszkiewicz, J. Truu, P. Rutkowski, M. Piotr, G. Pasternak, International Biodeterioration & Biodegradation Relationship between biodiversity and power generated by anodic bacteria enriched from petroleum-contaminated soil at various potentials, 194 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2024.105849>.
- [245] K. Venkidusamy, M. Megharaj, M. Marzorati, R. Lockington, R. Naidu, Enhanced removal of petroleum hydrocarbons using a bioelectrochemical remediation system with pre-cultured anodes, *Sci. Total Environ.* 539 (2016) 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.098>.
- [246] O. Adelaja, T. Keshavarz, G. Kyazze, Treatment of phenanthrene and benzene using microbial fuel cells operated continuously for possible in situ and ex situ

- applications, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 116 (2017) 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.021>.
- [247] P. Roustazadeh Sheikhyousefi, M. Nasr Esfahany, A. Colombo, A. Franzetti, S.P. Trasatti, P. Cristiani, Investigation of different configurations of microbial fuel cells for the treatment of oilfield produced water, *Appl. Energy*. 192 (2017) 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.10.057>.
- [248] G. Mohanakrishna, I.M. Abu-Reesh, R.I. Al-Raoush, Biological anodic oxidation and cathodic reduction reactions for improved bioelectrochemical treatment of petroleum refinery wastewater, *J. Clean. Prod.* 190 (2018) 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.141>.
- [249] S. Sevda, I.M. Abu-Reesh, H. Yuan, Z. He, Bioelectricity generation from treatment of petroleum refinery wastewater with simultaneous seawater desalination in microbial desalination cells, *Energy Convers. Manag.* 141 (2017) 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.05.050>.
- [250] 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.* 25 (2003) 1531–1535. <https://doi.org/10.1023/A:1025484009367>.
- [251] J. Truu, P. Młynarz, The influence of benzene on the composition , diversity and performance of the anodic bacterial community in glucose-fed microbial fuel cells, (2024). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1384463>.
- [252] D.G. Sanderson, E.L. Gross, M. Seibert, A photosynthetic photoelectrochemical cell using phenazine methosulfate and phenazine ethosulfate as electron acceptors, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14 (1987) 1–20. <https://doi.org/10.1007/BF02798494>.
- [253] G. Lepage, F.O. Albernaz, G. Perrier, G. Merlin, Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes, *Bioresour. Technol.* 124 (2012) 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.067>.
- [254] D. Ucar, Y. Zhang, I. Angelidaki, An overview of electron acceptors in microbial fuel cells, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00643>.
- [255] S. Chen, S.A. Patil, R.K. Brown, U. Schröder, Strategies for optimizing the power output of microbial fuel cells: Transitioning from fundamental studies to practical implementation, *Appl. Energy*. 233–234 (2019) 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.10.015>.
- [256] M.P. Tomasino, M. Aparício, I. Ribeiro, F. Santos, M. Caetano, C.M.R. Almeida, M. de F. Carvalho, A.P. Mucha, Diversity and hydrocarbon-degrading potential of deep-sea microbial community from the mid-atlantic ridge, south of the azores (North atlantic ocean), *Microorganisms*. 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112389>.
- [257] X. Liu, Z. Li, C. Zhang, X. Tan, X. Yang, C. Wan, D.J. Lee, Enhancement of anaerobic degradation of petroleum hydrocarbons by electron intermediate: Performance

- and mechanism, *Bioresour. Technol.* 295 (2020) 122305. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122305>.
- [258] P. Dessì, C. Sánchez, S. Mills, F.G. Cocco, M. Isipato, U.Z. Ijaz, G. Collins, P.N.L. Lens, Carboxylic acids production and electrosynthetic microbial community evolution under different CO₂ feeding regimens, *Bioelectrochemistry*. 137 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107686>.
- [259] K. Chandrasekhar, S. Venkata Mohan, Bio-electrochemical remediation of real field petroleum sludge as an electron donor with simultaneous power generation facilitates biotransformation of PAH: Effect of substrate concentration, *Bioresour. Technol.* 110 (2012) 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.128>.
- [260] A. de Rosset, N. Tyszkiewicz, J. Wiśniewski, N. Pudełko-Malik, P. Rutkowski, P. Młynarz, G. Pasternak, Bioelectrochemical synthesis of rhamnolipids and energy production and its correlation with nitrogen in air-cathode microbial fuel cells, *J. Environ. Manage.* 365 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121514>.
- [261] G. Pasternak, J. Greenman, I. Ieropoulos, Regeneration of the power performance of cathodes affected by biofouling, *Appl. Energy*. 173 (2016) 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.04.009>.
- [262] W.V. and K.R. Bruce E. Logan, Bert Hamelers, René Rozendal, Uwe Shroder, Jurg Keller, Stefano Freguia, Peter Aelterman, Critical Review Microbial Fuel Cells : Methodology and Technology, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5181–5192. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0605016>.
- [263] J.G. Leahy, R.R. Colwell, Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiol. Rev.* 54 (1990) 305–315. <https://doi.org/10.1128/membr.54.3.305-315.1990>.
- [264] G. Mohanakrishna, I.M. Abu-Reesh, S. Kondaveeti, R.I. Al-Raoush, Z. He, Enhanced treatment of petroleum refinery wastewater by short-term applied voltage in single chamber microbial fuel cell, *Bioresour. Technol.* 253 (2018) 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.005>.
- [265] L. Shi, D.J. Richardson, Z. Wang, S.N. Kerisit, K.M. Rosso, J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer, *Environ. Microbiol. Rep.* 1 (2009) 220–227. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00035.x>.
- [266] E.M. Bosire, M.A. Rosenbaum, Electrochemical potential influences phenazine production, electron transfer and consequently electric current generation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00892>.
- [267] M.J. Al Lawati, T. Jafary, M.S. Baawain, A. Al-Mamun, A mini review on biofouling on air cathode of single chamber microbial fuel cell; prevention and mitigation strategies, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 22 (2019) 101370. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101370>.
- [268] X. Zhang, W. He, L. Ren, J. Stager, P.J. Evans, B.E. Logan, COD removal

- characteristics in air-cathode microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 176 (2015) 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.001>.
- [269] A. Rochex, J.M. Lebeault, Effects of nutrients on biofilm formation and detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine, *Water Res.* 41 (2007) 2885–2892. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.041>.
- [270] J. Yu, J. You, P.N.L. Lens, L. Lu, Y. He, Z. Ji, J. Chen, Z. Cheng, D. Chen, Biofilm metagenomic characteristics behind high coulombic efficiency for propanethiol deodorization in two-phase partitioning microbial fuel cell, *Water Res.* 246 (2023) 120677. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120677>.
- [271] L. Hu, Y. Chen, Q. Zhang, S. Yang, H. Zhang, J. Peng, Y. Zhang, Z. Li, Y. Huang, Sodium Acetate as Residual-Free Presodiation Additive for Enhancing the Energy Density of Sodium-Ion Batteries, *ACS Energy Lett.* 9 (2024) 1148–1157. <https://doi.org/10.1021/acsenergylett.3c02744>.
- [272] N.H. Youssef, K.E. Duncan, D.P. Nagle, K.N. Savage, R.M. Knapp, M.J. McInerney, Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms, *J. Microbiol. Methods.* 56 (2004) 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>.
- [273] S.F. Burlatsky, V. V. Atrazhev, D. V. Dmitriev, V.I. Sultanov, E.N. Timokhina, E.A. Ugolkova, S. Tulyani, A. Vincitore, Surface tension model for surfactant solutions at the critical micelle concentration, *J. Colloid Interface Sci.* 393 (2013) 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.10.020>.
- [274] P.M. Domingues, A. Almeida, L. Serafim Leal, N.C.M. Gomes, Â. Cunha, Bacterial production of biosurfactants under microaerobic and anaerobic conditions, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 16 (2017) 239–272. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9429-y>.
- [275] V.K. Gaur, P. Sharma, R. Sirohi, S. Varjani, M.J. Taherzadeh, J.S. Chang, H. Yong Ng, J.W.C. Wong, S.H. Kim, Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview, *Bioresour. Technol.* 343 (2022) 126059. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126059>.
- [276] F. Harnisch, J.S. Deutzmann, S.T. Boto, M.A. Rosenbaum, Microbial electrosynthesis: opportunities for microbial pure cultures, *Trends Biotechnol.* xx (2024) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2024.02.004>.