

ZAŁĄCZNIK A2

Autoreferat w języku polskim

Mikrobiologiczne wytwarzanie wodoru jako alternatywnego źródła energii przy wykorzystaniu organicznych substancji odpadowych

Dr Krystyna Anna Seifert

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Chemii

Zakład Kinetyki i Katalizy

Spis treści

- 1. Informacje o autorze**
- 2. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz.U. z 2016 r. poz. 1311.)**
 - 2.1. Tytuł rozprawy habilitacyjnej**
 - 2.2. Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, stanowiących osiągnięcie naukowe autora. Określenie wkładu autora.**
 - 2.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania**
- 3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych autora oraz dalsze plany badawcze**

1. Informacje o autorze

1.1. Imię i nazwisko: Krystyna Anna Seifert

1.2. Dane kontaktowe:

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Wydział Chemii

Ul. Umultowska 89b

61-614 Poznań

Tel:+48 61 829 1784

e-mail: seifk@amu.edu.pl

1.3. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania.

- 04.02.1980 magister chemii; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii; tytuł pracy magisterskiej: "Badanie aktywności katalitycznej układu $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$ w reakcji odwodornienia etylenobenzenu do styrenu"; promotor: prof. dr hab. Florian Domka
- 03.07.2003 doktor nauk chemicznych; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii; tytuł pracy doktorskiej: „Badania oporności na inhibicję niektórych związków chemicznych w procesie denitryfikacji”; promotor: prof. dr hab. Florian Domka

1.4. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 01.04.1980 – 30.09.2005 pracownik naukowo-techniczny, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii; Zakład Kinetyki i Katalizy
- 01.10.2005 – obecnie adiunkt, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii; Zakład Kinetyki i Katalizy

2. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz.U. z 2016 r. poz. 1311.)

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki

(Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.) jest jednotematyczny cykl publikacji naukowych obejmujący 9 pozycji (H1 – H9).

2.1. Tytuł rozprawy habilitacyjnej

Mikrobiologiczne wytwarzanie wodoru jako alternatywnego źródła energii przy wykorzystaniu organicznych substancji odpadowych.

2.2. Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, stanowiących osiągnięcie naukowe autora. Określenie wkładu autora.

2.2.1. Artykuły naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Report (JCR)

Lp.	Publikacja	Impact Factor/ Pkt MNISW w roku wydania	Impact Factor 5-cio letni	Liczba cytowań ^a	Udział w pracy
H1	Seifert, K., Waligórska, M.(70%), Wojtowski, M.(5%), Laniecki, M.(5%) Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. International Journal of Hydrogen Energy, 34 (9) pp. 3671-3678, 2009 <i>Mój udział w pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowanie prób i wykonanie pomiarów metabolitów, opracowanie wyników badań w formie tabel i wykresów, współtworzenie manuskryptu</i>	3,548 24	3,647	66	20%
H2	Seifert, K., Waligórska, M.(65%), Laniecki, M.(5%) Brewery wastewater in photobiological hydrogen generation in presence of <i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U. 001 International Journal of Hydrogen Energy, 35 (9) pp. 4085-4091, 2010 <i>Mój udział w pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu większej części pomiarów pH, biomasy, CH₂, H₂ i CO₂, interpretacji wyników oraz współudziale w opracowaniu manuskryptu</i>	3,548 32	3,647	32	30%
H3	Seifert, K., Waligórska, M.(2.5%), Laniecki, M.(2.5%) Hydrogen generation in photobiological process from dairy wastewater. International Journal of Hydrogen Energy, 35 (18) pp. 9624-9629, 2010 <i>Mój udział w pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, koordynowaniu przebiegu prac, przygotowaniu pożywek do prowadzenia procesu, obróbce wstępnej ścieku, wykonaniu większej części eksperymentów, pomiarze metabolitów gazowych i ciekłych oraz interpretacji wyników i samodzielnym opracowaniu manuskryptu</i>	3,548 32	3,647	44	95%

H4	Wicher, E.(35%), Seifert, K. , Zagrodnik, R.(5%), Pietrzyk, B.(5%), Laniecki, M.(5%) Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, 38 (19) pp. 7767-7773, 2013	2,93 35	3,448	21	50%
<i>Mój udział w pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, koordynowaniu przebiegu prac, zaplanowaniu metodyki badań, opracowaniu danych, interpretacji wyników i napisaniu manuskryptu</i>					
H5	Zagrodnik, R.(50%), Seifert, K. , Stodolny, M.(5%), Laniecki, M.(5%) Continuous photofermentative production of hydrogen by immobilized <i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U. 001 International Journal of Hydrogen Energy, 40 pp. 5062-5073, 2015	3,582 30	3,647	11	40%
<i>Mój udział w pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, koordynowaniu przebiegu prac, wykonaniu części badań, spektrofotometrycznym pomiarze biomasy, współudziale w interpretowaniu wyników i opracowaniu manuskryptu</i>					
H6	Seifert, K. , Dyba, K.(10%), Góra-Marek, K.(5%), Stodolny, M.(5%), Zagrodnik, R.(5%), Laniecki, M.(5%) Fermentative production of hydrogen in presence of modified mesoporous silica SBA-15 International Journal of Hydrogen Energy, 41 (42) pp. 19367-19372, 2016	3,582 30	3,647	0	70%
<i>Mój udział w pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, koordynowaniu przebiegu prac, opracowaniu metodyki badań, wykonaniu większej części badań, przygotowaniu pożywek dla bakterii, immobilizacji mikroorganizmów, chromatograficznym pomiarze wodoru i CO₂, pomiarze pH i CHZT, współudziale w interpretowaniu wyników i opracowaniu manuskryptu</i>					
H7	Seifert K. , Zagrodnik R. (10%), Stodolny M.(5%), Laniecki M.(5%), Biohydrogen production from chewing gum manufacturing residue in two-step process of dark fermentation and photofermentation, Renewable Energy 122,526-532,2018	4,357 30	4,825	1	80%
<i>Mój udział w pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, koordynowaniu przebiegu prac, opracowaniu metodyki badań, wykonaniu większej części pomiarów metabolitów gazowych, biomasy i CHZT oraz współudziale w interpretowaniu wyników i opracowaniu manuskryptu</i>					
Suma		25,1 213	26,71	175	385
średnia		3,59 30,43	3,815	25	55

^aCytowania na dzień 30.05.2018 według bazy Scopus

2.2.2. Rozdziały w monografiach w języku angielskim

Lp.	publikacja	Udział w pracy
H8	Seifert, K., Zagrodnik, R.(5%), Stodolny, M.(5%), Laniecki, M.(5%) Photofermentative Hydrogen Generation In Presence of Waste Water from food industry "BIOGAS" ISBN 979-953-307-221-9 InTech, Rijeka, 2012 <i>Mój udział w pracy polegał na: zaplanowaniu tematu i doborze materiału teoretycznego do monografii, napisanie większej części podrozdziałów i zestawienie całości artykułu</i>	85%
H9	Seifert, K., Thiel, M. (10%), Wicher, E.(10%), Włodarczak, M.(5%), Laniecki, M.(5%) Microbiological Methods of Hydrogen Generation "BIOGAS" ISBN 979-953-307-221-9 InTech, Rijeka, 2012 <i>Mój udział w pracy polegał na: zaplanowaniu tematu i doborze materiału teoretycznego do monografii, napisanie części podrozdziałów i zestawienie całości artykułu</i>	70%
Suma	H1 – H9 = 540	155
Średni udział	H1 – H9 = 60%	

Pełne artykuły i monografie wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej znajdują się w załączniku 2

2.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania

Wstęp

Energia jest głównym elementem szybkiego rozwoju gospodarczego społeczeństw. Obecny system transportu i pozyskiwanie energii dla przemysłu bazują na paliwach kopalnych, które są ekologicznie szkodliwe a ich rezerwy są ograniczone. Wyczerpywanie zasobów paliw kopalnych zmusza świat do poszukiwania nowych, alternatywnych źródeł energii. Wydaje się, że jednym z nich może być wodór, którego produkcja jest procesem przyjaznym dla środowiska naturalnego i może on być wszechstronnie zastosowany w energetyce. Jest czystym, wysokoenergetycznym paliwem, którego ciepło spalania wynosi $142,35 \text{ kJ g}^{-1}$, a wartość ta jest prawie 3 razy większa niż w paliwach węglowodorowych. Ponadto jego produkcja jest procesem bezodpadowym ponieważ jedynym produktem ubocznym jest woda [1-7].

Dobrze już znane przemysłowe metody generowania wodoru, takie jak konwersja metanu z parą wodną (SMR) oraz innych węglowodorów, kraking i reforming różnych frakcji ropy naftowej oraz elektroliza wody posiadają bardzo istotną wadę – są bezpośrednio, bądź pośrednio oparte na paliwach kopalnych. Dodatkowo elektroliza wody wymaga dostarczenia energii elektrycznej (do wyprodukowania 1kg wodoru, w procesie elektrolizy wody potrzeba 46 kWh)[1]. Ponadto w trakcie generowania wodoru tradycyjnymi metodami powstają ogromne ilości CO₂.

Podstawowym czynnikiem decydującym o zastosowaniu wodoru jako paliwa na szeroką skalę, jest w związku z tym, jego odnawialny i nieszkodliwy dla środowiska sposób pozyskiwania. Badania prowadzone nad tym zagadnieniem doprowadziły do opracowania

wielu metod. Wśród nich można wyróżnić procesy termochemiczne, fotochemiczne, fotokatalityczne, fotoelektrochemiczne i biokatalityczne [2].

Na szczególną uwagę zasługują biologiczne metody generowania wodoru. Zaletami tych procesów są: odnawialność, brak emisji toksycznych zanieczyszczeń, łagodne warunki prowadzenia procesu (temperatura zbliżona do pokojowej, ciśnienie atmosferyczne). W rezultacie metody te charakteryzują się niższym kosztem wytwarzania, a przede wszystkim stwarzają możliwości utylizacji ścieków i produktów odpadowych, wykorzystywanych jako źródło węgla organicznego. Można do tego celu wykorzystywać ścieki np. z produkcji przemysłu spożywczego, cukrowniczego, gorzelnianego, a także organiczną frakcję odpadów stałych, nawet z przydomowych kuchni lub ogrodów [3,4].

Obecnie na świecie produkuje się około 50 mln ton wodoru i ilość ta ciągle rośnie (prawie 10% na rok). Na podstawie danych z programu National Hydrogen Program of the United States wiemy, że udział wodoru w całkowitym rynku energetycznym będzie wynosił 8-10% w 2025. Departament Energii Stanów Zjednoczonych szacuje, że taka produkcja wodoru i oparty na nim system transportu będzie dostępny we wszystkich regionach Stanów Zjednoczonych do 2040 [8,9,10].

Do biologicznych metod generowania wodoru zalicza się: biofotolizę wody, ciemną fermentację oraz fotofermentację [6,7,11-15].

Praca ta skupia się na procesach fermentacji ze względu na możliwość wykorzystania w nich ścieków spożywczych i stałych substancji odpadowych z przetwórstwa żywności. Substancje te mogą służyć, jako źródło węgla organicznego w procesie generowania wodoru w warunkach beztlenowych z udziałem bakterii heterotroficznych [14]. Kryteria doboru ścieków powinny uwzględniać biodegradowalność zawartych w nich związków organicznych i koszt prowadzenia procesu. Cukry proste takie jak glukoza, sacharoza czy laktoza są łatwo biodegradowalne i dlatego stanowią doskonały substrat do produkcji wodoru. Większość ścieków wymaga wstępnej obróbki zanim zostaną poddane procesowi biofermentacji. Ścieki z rolnictwa i przemysłu spożywczego są bogate w skrobię i celulozę. Skrobię, celulozę czy lignocelulozę poddaje się hydrolizie kwaśnej lub enzymatycznej, po której następuje konwersja węglowodanów do kwasów organicznych i dalej do wodoru [9]. W metodach fermentacyjnych wykorzystuje się ścieki z przemysłu cukrowniczego [16], mleczarskiego [17] z produkcji tofu lub przetwórstwa soi [18].

W procesie ciemnej fermentacji aby wytwarzać wodór w sposób ciągły i wydajny, należy zahamować konkurencyjne procesy metanogenezy odpowiedzialne za produkcję metanu.

W fotofermentacji dodatkowo czynnikiem limitującym proces jest zawartość azotu w ścieku, który inhibituje nitrogenazę odpowiedzialną za produkcję wodoru.

Połączenie ciemnej fermentacji i fotofermentacji pozwala na wydajne przetwarzanie różnorodnych rodzajów ścieków i wygenerowanie maksymalnej ilości wodoru. W pierwszym etapie, w procesie ciemnej fermentacji, związki organiczne zawarte w ściekach przetwarzane są do H_2 , CO_2 , lotnych kwasów tłuszczowych i alkoholi. Wytworzone metabolity ciekłe stanowią substrat organiczny w drugim etapie generowania wodoru - w procesie fotofermentacji. Taki układ hybrydowy poprawia wydajność produkcji wodoru i w efekcie bilans ekonomiczny przetwarzania ścieków [19-21].

Do tej pory nie opracowano żadnego procesu biologicznej produkcji wodoru na skalę techniczną, ponieważ uzyskiwane wydajności i szybkości generowanego wodoru były zbyt niskie, aby zabezpieczyć ciągłą produkcję energii w ogniwach paliwowych. Wprowadzenie systemów hybrydowych i bioreaktorowych z immobilizowanymi mikroorganizmami daje szansę na poprawienie tej sytuacji [22-26].

W Polsce produkuje się ok. 80 hm³ ścieków spożywczych w ciągu roku z czego tylko ok. 5% jest poddawana oczyszczaniu i to najczęściej jedynie mechaniczemu. Przykładowo, typowa polska mleczarnia wytwarza 450-600 m³ ścieków/dobę, z których prawie połowa odprowadzana jest bezpośrednio do wód lub do ziemi. Natomiast ilość ścieków powstających w browarze szacuje się na 3-4 hl na 1hl wyprodukowanego piwa. W Polsce znajduje się około 100 browarów, które produkują łącznie około 40 mln hektolitrow piwa rocznie, co daje nam 3 miejsce w Unii Europejskiej. Dlatego też zagospodarowanie ścieków spożywczych i wykorzystanie ich do produkcji wodoru jest celowe pod względem ekonomicznym i środowiskowym.

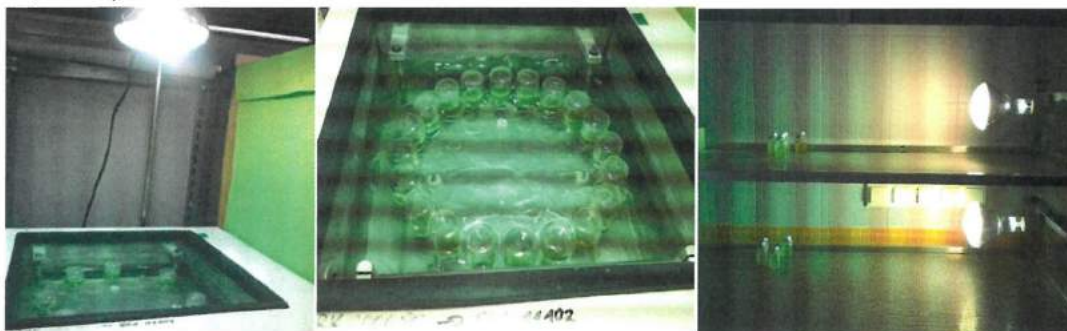
Cel badań

Celem przeprowadzonych prac badawczych było uzyskanie optymalnych warunków generowania wodoru w procesie fermentacji ciemnej i jasnej z wykorzystaniem substancji odpadowych jako jedyne substratu organicznego. W badaniach, jako substrat, wykorzystywano ścieki i odpady z przemysłu spożywczego, gorzelnianego, mleczarskiego a także glicerynę – główny odpad przy produkcji biopaliw. Źródłem mikroorganizmów w procesie ciemnej fermentacji był osad fermentacyjny natomiast w procesie fotofermentacji stosowano czystą kulturę bakterii *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. Celem poprawienia wydajności i szybkości procesu przebadano układ hybrydowy łączący oba procesy fermentacji w systemie półciągłym i ciągłym oraz zastosowano immobilizację bakterii. Dokonano analizy produktów gazowych i ciekłych w czasie trwania procesu. Na podstawie badań kinetycznych procesu opracowano jego model kinetyczny, wyznaczono stężenia graniczne substratów, szybkość procesu i okres indukcji.

I. Metodyka badań

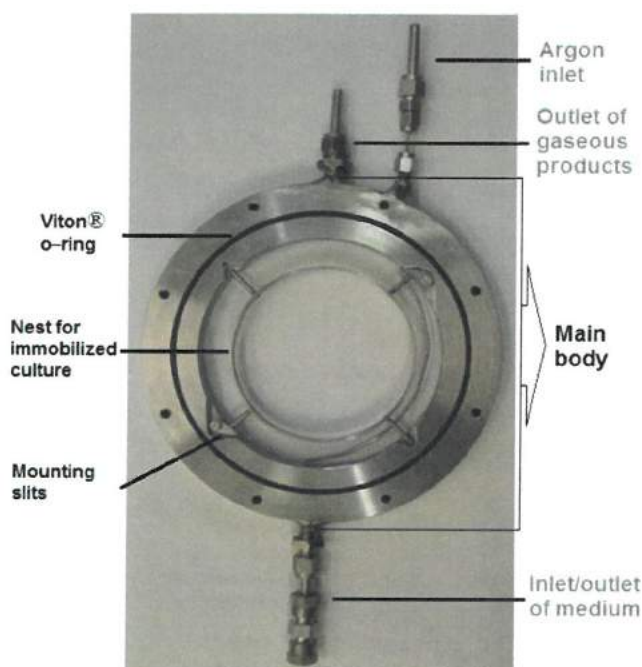
Fotofermentacja

W procesie fotofermentacji eksperymenty prowadzone w systemie okresowym (batch) wykonywano w szklanych reaktorkach, o objętości równej 25cm³ (przy objętości roboczej 12,5 cm³).



Sposoby naświetlania reaktorów w procesie fotofermentacji

Do badań prowadzonych w systemie ciągłym i półciągłym stosowano płaski, stalowo-szkłany, okrągły reaktor o objętości 235 cm³, zaprojektowany w naszym zespole badawczym. W procesie wykorzystywano szczep bakterii *Rhodobacter Sphaeroides O.U.001*. (ATCC 49419). Namnażanie bakterii wykonywano na podłożu van Niel a proces produkcji wodoru prowadzono na pożywce Biebl&Pfennig. Próby zaszczepiano inokulum o określonej objętości (od 5-40% v/v tj.: od 0,065 – 0,388 g suchej masy/l) a następnie korygowano pH (zakres pH 5,5 – 9) do wartości optymalnej dla danego procesu. Reaktorki odtleniano przedmuchując je argonem, szczelnie zamykano i inkubowano w temperaturze 28 °C.



Bioreaktor do prowadzenia procesów w systemie ciągłym

Przebadano szeroki zakres natężenia oświetlenia od 4 – 13 klx stosując lampę 300W Ultra-Vitalux o spektrum zbliżonym do spektrum światła słonecznego.

Ciemna fermentacja

Proces ciemnej fermentacji prowadzono w 60 cm³ reaktorkach, przy objętości roboczej 30 cm³. Inokulum stanowił osad fermentacyjny pochodzący z miejskiej oczyszczalni ścieków, który gotowano przez 15 minut celem usunięcia bakterii metanogennych. Proces produkcji wodoru prowadzono na pożywce glukozowej (7g/l) zawierającej dodatkowo odpowiednie makro- i mikroelementy.

Przebadano szeroki zakres stężeń inokulum (od 5-50% v/v osadu fermentacyjnego) i pH (4,5-6,5 co 0,5 jednostki). Reaktorki przed procesem odtleniano przedmuchując argonem, szczelnie zamykano i inkubowano w temperaturze 37°C.

Hybryda

Proces hybrydowy prowadzono w systemie dwu-etapowym. Pierwszy etap stanowiła ciemna fermentacja. Biomasa powstała w tym etapie była odwirowywana, a ciekłe metabolity

stanowiły substrat organiczny w procesie fotofermentacji (drugi etap). Warunki prowadzenia obu procesów opisano wyżej.

Substraty

Podstawowym substratem organicznym w doświadczeniach były ścieki: mleczarskie, piwowarskie i gorzelniane z kukurydzy a także gliceryna oraz odpad z produkcji gumy do żucia. Ścieki stosowane w badaniach poddawano obróbce wstępnej w zależności od rodzaju ścieku i ich struktury. W przypadku ścieku gorzelnianego oraz gliceryny wystarczało jedynie rozcieńczanie. Natomiast surowy ściek mleczarski i piwowarski filtrowano, sterylizowano w 120°C przez 20 minut.

Metody analityczne

- pomiar gazów (H₂ i CO₂) wykonywano metodą chromatograficzną (Varian GC-3800, detektor TCD, kolumna kapilarna CARBOPLOT P7)
- ubytek związków organicznych (CHZT) mierzono metodą dichromianową
- natężenie oświetlenia mierzono luxometrem Lx204 (w klx) i piranometrem CMP3 firm Kipp&Zonen (w W/m²)
- pH mierzono elektrodą szklaną ERH-11
- biomasę wyznaczono z zależności suchej masy od zmętnienia. Zmętnienie mierzono przy długości fali 660nm, korzystając ze spektrofotometru DU 640 firmy Beckmann
- suchą masę TS (Total Solids) i VSS (Volatile Suspended Solids) określano zgodnie z normą
- do ilościowego i jakościowego określenia składu chemicznego ścieku i osadu fermentacyjnego zastosowano analizę elementarną pierwiastków C, H, N, S. Pomiaru dokonano na aparacie Vario EL III Elementary
- do oznaczenia zawartości wapnia, magnezu, żelaza, niklu, ołowiu i kadmu zastosowano metodę atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem plazmowym. Analizy wykonano z wykorzystaniem spektrometru emisyjnego Varian ICP-OES VISTA-MPX (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer)
- stężenie fosforanów oznaczono metodą kolorymetryczną z molibdenianem amonu i chlorkiem cyny(II). Analizę wykonywano na spektrofotometrze UV-vis firmy Beckman DU640 przy długości fali 700 nm
- rozkład termiczny odpadów stałych (DTG i DTA) analizowano metodą termogravimetryczną (Aparat Setsys 1200 firmy Setaram)
- stężenie jonów amonowych oznaczono za pomocą testów Spectroquant firmy MERCK
- zawartość związków organicznych (cukrów, kwasów i alkoholi) przed i po procesie mierzono metodą chromatografii ciekowej HPLC (Dionex, model UltiMate 3000, ThermoScientific, SHODEX sugar column SH 1011, RI detector, przepływ 1ml/1min - eluent 5 mM H₂SO₄).
- do modelowania kinetycznego procesu stosowano program Micro Math SCIENTIST wykorzystując matematyczny model Gompertza, który pozwolił na obliczenie stężeń produktów gazowych i ciekłych, szybkości procesu, okresu indukcji i odchylenia standardowych.
- analizę mikrobiologiczną osadu fermentacyjnego dotyczącą występowania bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* spp. i *Clostridium* spp. wykonał zespół Zakładu Mikrobiologii

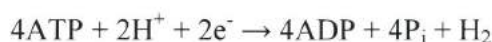
Wydziału Biologii UAM w Poznaniu, pod kierownictwem Prof. dr hab. Adama Kaznowskiego.

II. Wyniki badań

1. Proces fotofermentacji

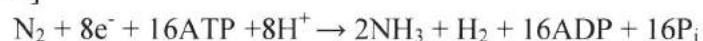
1.1. Wprowadzenie

Fotofermentacja to proces, w którym bakterie heterotroficzne, w obecności światła, rozkładają związki organiczne głównie do wodoru i CO₂. Wydajnymi substratami do fotoprodukcji wodoru są ścieki organiczne, które charakteryzują się niskim stężeniem azotu. Proces ten jest katalizowany przez dwa enzymy: nitrogenazę i hydrogenazę. Nitrogenaza jest podstawowym enzymem odpowiedzialnym za produkcję wodoru a hydrogenaza katalizuje proces odwrotny - utlenia część wytworzonego wodoru [27].



Warunkiem koniecznym aby nitrogenaza katalizowała produkcję wodoru jest układ wolny od azotu.

Kiedy w układzie znajduje się azot zasadniczą funkcją nitrogenazy jest przekształcanie azotu do amoniaku [28, 29]



Inhibitorem nitrogenazy jest przede wszystkim tlen, który nieodwracalnie niszczy centrum aktywne enzymu. Jony amonowe natomiast inhibują syntezę enzymu i obniżają jego aktywność [30, H9].

Stosowane w doświadczeniach purpurowe niesiarkowe bakterie (PNS) *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 są wydajnym biokatalizatorem w procesach otrzymywania wodoru ze ścieków pochodzących z przemysłu mleczarskiego, spożywczego i gorzelnianego oraz cukrowniczego.

Do badań zastosowano ścieki piwowarskie (H2, H8) i mleczarskie (H3, H8). Ścieki te są produkowane w dużych ilościach i charakteryzują się wysokim ładunkiem CHZT (27-220 g O₂ /l). Wydaje się więc, że wykorzystanie ścieku piwowarskiego i mleczarskiego do produkowania wodoru jest znakomitym pomysłem na stworzenie alternatywnego źródła energii z jednoczesnym efektywnym zagospodarowaniem kłopotliwych ścieków. Tym bardziej, że Polska jest trzecim na świecie producentem mleka i trzecim w UE producentem piwa.

1.2. Ściek piwowarski

Surowy nierozcieńczony ściek piwowarski powodował całkowite zahamowanie procesu. Dlatego też, w badaniach ściek rozcieńczano tak, aby jego zawartość w pożywce wynosiła od 1 do 20% v/v. Dodatkowo, dla uzyskania wyższej wydajności produkcji wodoru, ściek poddano obróbce termicznej w temperaturze 120°C przez 20 minut w celu usunięcia konkurencyjnych bakterii metanogennych i rozpuszczenia osadów. Badania prowadzono w temperaturze 28 ± 2°C przy natężeniu oświetlenia wynoszącym 9 klx (116 W/m²). Pożywka była zaszczipiana 30% v/v bakterii *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 (0,36g suchej masy/l).

W celu sprawdzenia czy rozcieńczony ściek zawiera optymalną ilość azotu, dodawano do układu glutaminian sodu (od 0 do 0.72 g/l). Zmiana stężenia glutaminianu sodu nie wpływała na ilość wydzielonego wodoru, powodowała jedynie zwiększenie przyrastającej biomasy (od 1.4 do 2.6 g suchej masy/l) i ubytku CHZT (od 2.5 do 3.3 g O₂/l). Zatem ilość związków azotowych zawartych w rozcieńczonym ścieku piwowarskim była wystarczająca dla wzrostu bakterii i prowadzenia procesu.

Wyznaczono maksymalne stężenie ścieku piwowarskiego (10% v/v) umożliwiające efektywną, porównywalną ze standardem, przemianę do wodoru (2.24 l/l pożywki).

Ze wzrostem stężenia ścieku do 10% v/v wzrastała ilość wydzielonego wodoru (od 0.86 do 2.24 l/l pożywki). Wzrastała także biomasa (0.75 do 2.6 g suchej masy/l) i ubytek CHZT (1.9 do 3.8 g O₂/l). Zwiększenie stężenia ścieku do 20% v/v powodowało obniżenie ilości wytwarzanego wodoru do 0.52 l/l i znaczny spadek ubytku CHZT. Nasuwa to wniosek, że im wyższe stężenie ścieku tym większa ilość substancji inhibitujących, między innymi metali ciężkich (Ca, Fe, Mg), które w znacznym stopniu zmieniają metabolizm bakterii. Ponadto ze wzrostem stężenia ścieku obserwowano powstawanie coraz większej ilości kwasów, głównie octowego i mlekowego, co miało swoje odzwierciedlenie w spadku pH w trakcie procesu (7.1 do 5.2). Przy wysokim stężeniu ścieku następuje także zmiana koloru pożywki na ciemniejszą, co utrudnia dostęp światła do wnętrza reaktora i obniża efektywność procesu.

Tabela 1. Parametry kinetyczne procesu fotofermentacji przy różnych początkowych stężeniach ścieku piwowarskiego.

Stężenie ścieku (% v/v)	H _{max} (l/l _{pozywki})	R _{max,H2} (l/l/h)	λ _{H2} (h)	Y (l H ₂ /l ścieku)
1	0.86	0.046	8.0	0.009
3	1.17	0.045	6.1	0.035
5	1.40	0.042	6.1	0.07
10	2.24	0.061	9.4	0.22
20	0.52	0.040	18.7	0.10
standard*	2.3	0.047	2.7	-

* pożywka standardowa z kwasem L-jabłkowym, H_{max} – maksymalna ilość wodoru, R_{max} – maksymalna szybkość produkcji wodoru, λ – czas indukcji, Y – wydajność substratowa

Przeprowadzono także badania kinetyczne i obliczono parametry kinetyczne wykorzystując równanie Gompertza zarówno dla produkowanego wodoru jak i CO₂. Gdy stężenie ścieku wynosiło 20% v/v obserwowano spadek szybkości powstawania wodoru od 0.061 do 0.040 l H₂/l medium/h i dwukrotne wydłużenie okresu indukcji (tabela 1).

Podczas badań kinetycznych prowadzonych w układzie dzień/noc zaobserwowano całkowite zahamowanie procesu tworzenia wodoru w ciągu nocy. Ponadto obserwowano: bardzo słaby przyrost bakterii, spadek pH i brak redukcji CHZT. Jednakże podczas ponownego naświetlania (w ciągu dnia) mikroorganizmy podejmowały pracę i dalej produkowały wodór. Ważnym aspektem jest fakt, że głównym składnikiem biogazu powstałego w badanym procesie był wodór (aż do 90%).

Podsumowując:

- ściek piwowski można zastosować jako substrat w procesie fotofermentacji po termicznej obróbce i rozcieńczeniu do 10% v/v
- maksymalna produkcja wodoru była porównywalna do układu standardowego i wynosiła 2.24 l H₂/l medium
- zawartość wodoru w biogazie wynosiła 91% (dla układu standardowego 94%)
- maksymalny ubytek CHZT wynosił około 20%
- maksymalna szybkość produkcji wodoru wynosiła 0.061 l H₂/l medium/h (dla układu standardowego 0.047 l H₂/l medium/h)
- w cyklu dobowym (dzień/noc) pomimo zhamowania procesu w ciągu nocy, bakterie nadal produkowały wodór w okresach naświetlania.

1.3. Ściek mleczarski

Ściek mleczarski (**H3, H8**) testowano w systemie okresowym po wstępnej termicznej obróbce ścieku (120°C przez 20 minut), przy rozcieńczeniu 5 – 60% v/v medium. Badania prowadzono w temperaturze 28 ± 2°C i przy natężeniu oświetlenia wynoszącym 9 klx (116 W/m²). Pożywka była zaszczipiana 30% v/v bakterii *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 (0,36g suchej masy/l).

Ściek po sterylizacji zawierał dużą ilość osadu serwatkowego. Sprawdzone, czy sączenie tego osadu wpłynie na wydajność badanego procesu. Stwierdzono, że ściek niesączony jest wydajniejszym substratem, ponieważ osad serwatkowy zawiera laktozę, białka, tłuszcze oraz mlecza, które są przyswajalne przez bakterie *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 w procesie produkcji wodoru. Ponadto powstały osad jest częściowo rozpuszczalny w temperaturze prowadzonego procesu.

Wyznaczono maksymalne stężenie ścieku mleczarskiego pozwalające na efektywną, porównywalną do standardu, produkcję wodoru. Ze wzrostem stężenia ścieku od 5 do 40% v/v rosły: całkowita ilość wydzielonego wodoru, maksymalnie do 3.2 l H₂/l medium, ubytek CHZT do 4.2g O₂/l oraz wydajność substratowa do wartości 7.6 l H₂/l ścieku. Jednak spadała maksymalna szybkość procesu od 0.082 do 0.049 l H₂/l medium/h i wydłużał się czas indukcji procesu od 6.5 do 14.5 h (tabela 2). Zjawisko to związane jest z adaptacją mikroorganizmów do podłoża zawierającego wysokie stężenie ścieku (zawartość jonów Ca²⁺ w surowym ścieku była przeszło 100-krotnie większa, a jonów Mg²⁺ 4-krotnie większa w porównaniu do pożywki standardowej).

Tabela 2. Parametry kinetyczne procesu fotofermentacji przy różnych początkowych stężeniach ścieku mleczarskiego (sterylizowanego, niefiltrowanego)

Stężenie ścieku (% v/v)	H _{max} (l/l _{pozywki})	R _{max,H2} (l/l/h)	λ _{H2} (h)	Y (l H ₂ /l ścieku)	pH końcowe	ΔCHZT (g O ₂ /l)	ΔCHZT (%)	przyrost biomasy (g/l)
5	0.77	0.082	6.5	11.3	7.5	1.3	39	0.96
10	1.58	0.058	7.3	13.7	7.4	1.8	30	1.3
20	2.10	0.055	10.0	9.4	7.2	2.8	30	1.9
40	3.23	0.049	14.5	7.6	6.9	4.2	21	2.2
60	0	-	-	-	5.7	-	-	0.4
standard*	2.3	0.047	2.7	-	7.1	1.9	82	0.8

* pożywka standardowa z kwasem L-jabłkowym, H_{max} – maksymalna ilość wodoru, R_{max} – maksymalna szybkość produkcji wodoru, λ – czas indukcji, Y – wydajność substratowa

Kiedy zawartość ścieku w pożywce wynosiła 60% v/v proces produkcji wodoru był całkowicie zahamowany. W tym przypadku niskie końcowe pH (5.7) wskazuje na uaktywnienie się procesów fermentacyjnych produkujących kwasy, które obniżają pH i zaburzają proces produkcji wodoru. Ponadto, wysokie stężenie ścieku mleczarskiego w medium powodowało, że duża ilość osadu w pożywce znacznie ograniczała dostęp światła do układu i obniżała efektywność procesu.

W celu optymalizacji parametrów procesu przeprowadzono badania ze ściekiem mleczarskim jako substratem i kontrolą pH (około 7) w trakcie całego procesu fotofermentacji. Testy te dowiodły, że można otrzymać wysoką wydajność substratową (8.6 l H₂/l ścieku), wysoką całkowitą ilość produkowanego wodoru (3,6 l H₂/l medium) i wysoką maksymalną szybkość produkcji wodoru (0.056 l H₂/l/h) bez konieczności sterylizacji jeśli w układzie utrzymywane jest stałe pH.

Podsumowując:

- ściek mleczarski nie wymagał sterylizacji przed procesem prowadzonym z kontrolą pH , jednak konieczne było rozcieńczenie ścieku do 40% v/v
- maksymalna produkcja wodoru wynosiła 3.6 l H₂/l medium (2.24 l H₂/l medium dla układu standardowego)
- maksymalna szybkość produkcji wodoru wynosiła 0.056 l H₂/l medium/h (dla układu standardowego 0.047 l H₂/l medium/h)
- maksymalny ubytek CHZT wyniósł około 23% (82% dla układu standardowego, w którym substratem jest kwas jabłkowy).

1.4. Immobilizacja bakterii

Następnym etapem badań było określenie warunków produkcji wodoru w systemie ciągłym (**H5**). W tym celu przeprowadzono eksperymenty w płaskim bioreaktorze naszej konstrukcji. Matrycą do immobilizacji bakterii *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 była okrągła porowata płytka szklana oraz porowate i nieporowate kulki szklane. Dla poprawienia przyczepności bakterii i stabilności układu, powierzchnię szkła modyfikowano AEAPTMS (3-(2-aminoetyl)aminopropyl)trimetoksyilan).

Mikroorganizmy wzrastały na standardowej pożywce Biebl&Phennig a proces produkcji wodoru przeprowadzano w temperaturze $31 \pm 1^\circ\text{C}$, przy natężeniu oświetlenia 8 klx (102 W/m²).

Całkowita ilość wyprodukowanego wodoru w systemie ciągłym, przy zastosowaniu modyfikowanej płytki szklanej, wynosiła 4.19 l/reaktor, przy szybkości produkcji wodoru 12.7 ml/l medium/h, HRT (hydrauliczny czas retencji) wynoszącym 22 h. Dla porównania, badania prowadzone w tych samych warunkach w suspensji (bez immobilizacji komórek) pozwoliły na wyprodukowanie jedynie 2.39 l H₂/reaktor.

Zastosowanie matrycy niemodyfikowanej tylko nieznacznie poprawiało ilość produkowanego wodoru w porównaniu do układu bez immobilizacji komórek (od 2.39 do 2.95 l H₂/reaktor), przy tym samym czasie prowadzenia procesu w reaktorze (50 dni).

Natomiast modyfikowanie matrycy przyczyniło się do znacznego wzrostu produkowanego wodoru w porównaniu do matrycy niemodyfikowanej (od 2.95 do 4.14 l H₂/reaktor) oraz wydłużyło czas prowadzenia procesu w reaktorze z 50 do 70 dni.

Tabela 3. Zestawienie wyników badań z immobilizacją komórek bakteryjnych podczas procesu fotofermentacji przy zastosowaniu różnych rodzajów matrycy

Rodzaj matrycy	H ₂ [l/reaktor]	Szybkość produkcji wodoru [ml/l pożywki/h]	HRT [h]	Czas prowadzenia procesu [dni]
System ciągły				
Suspensja	2.39	2.5	22	50
niemodyfikowane szkło	2.95	5.7	22	50
modyfikowane szkło	4.19	12.7	22	70
nieporowate kulki	0.88	18	19.5	24
porowate kulki	1.15	26	16.8	24
System półciągły				
nieporowate kulki	0.5	12.1	72	30
porowate kulki	0.7	9.5	72	24

Badania prowadzone na matrycy z kulek porowatych i nieporowatych w systemie półciągłym dawały prawie dwa razy mniejsze ilości wodoru niż w systemie ciągłym. Jednak średnia wydajność substratowa produkcji wodoru w porównaniu z systemem ciągłym była o 30% wyższa, ponieważ długi czas przebywania pożywki w reaktorze pozwalał na lepsze wykorzystanie kwasu jabłkowego przez bakterie.

Podsumowując:

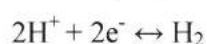
- imobilizowane bakterie *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 mogą wydajnie produkować wodór w systemie ciągłym
- w układzie z immobilizacją bakterii produkowana była większa ilość wodoru niż w układzie, w którym bakterie rosły w suspensji
- optymalnym systemem otrzymywania wodoru okazał się układ z modyfikowaną płytką szklaną, w którym uzyskano 60% więcej wodoru niż w układzie z płytką niemodyfikowaną; ponadto czas pracy reaktora wydłużył się o 30%.

2. Proces ciemnej fermentacji

2.1. Wprowadzenie

W procesie ciemnej fermentacji prowadzącej do produkcji wodoru najbardziej efektywnymi substratami są cukry, gliceryna, białka i tłuszcze. Oprócz wodoru może powstawać także dwutlenek węgla, metan i siarkowodór, oraz produkty ciekłe takie jak lotne kwasy tłuszczowe i alkohole. Udział wodoru w biogazie jest znacznie mniejszy (zazwyczaj około 50%) niż w procesie fotofermentacji.

Produkcja wodoru jest kontrolowana przez hydrogenazę, która katalizuje odwracalny proces redukcji protonów do cząsteczkowego wodoru [H₉]:



W procesie ciemnej fermentacji biorą udział bakterie anaerobowe z rodzaju *Enterobacter* [31], *Clostridium* [32], *Bacillus* [33], które przeprowadzają konwersję prostych związków organicznych w wodór, dwutlenek węgla i lotne kwasy tłuszczowe.

Proces ciemnej fermentacji jest częściej wykorzystywany do produkcji wodoru niż proces fotofermentacji, ponieważ jest niezależny od światła i jego dodatkową zaletą jest duża szybkość produkcji wodoru. Jest to niezwykle ważne w aspekcie zastosowania tej metody na skalę przemysłową.

Do badań wykorzystano osad fermentacyjny z miejskiej oczyszczalni ścieków jako naturalne źródło mikroorganizmów oraz glicerynę (**H1**) i ściek gorzelniany (**H4**) jako substraty organiczne. Dodatkowo przeprowadzono badania z immobilizacją osadu fermentacyjnego na matrycy wykonanej z mezoporowatej krzemionki SBA-15 w postaci niemodyfikowanej oraz modyfikowanej jonami -HSO_3 , -NH_2 and Al^{3+} (**H6**).

2.2. Gliceryna

Glicerynę jako substrat w procesie ciemnej fermentacji testowano w zakresie stężeń od 5 – 60 g/l. Badania prowadzono w systemie okresowym w temperaturze 37°C, przy początkowym pH 6. Pożywka była zaszczipiana mieszaniną bakterii pochodzącą z osadu fermentacyjnego w stężeniu 1.2, 2.3, 5.8 i 11.6 g VS/l (tj.: 5, 10, 25 i 50% v/v).

W optymalnym układzie uzyskano 0.41 mola H_2 /mol gliceryny (0.83 l H_2 /l medium) przy użyciu 10g gliceryny/l pożywki i stężeniu inokulum wynoszącym 1.2 g VS/l. Zużycie gliceryny w tym procesie było całkowite, a zawartość wodoru w biogazie wynosiła 51%.

Tabela 4. Optymalne parametry kinetyczne procesu ciemnej fermentacji dla wybranych początkowych stężeń gliceryny

Stężenie gliceryny (g/l)	Inokulum (g VS/l)	H_{\max} (l/l)	R_{\max, H_2} (l/l/h)	λ_{H_2} (h)	Y (mol/mol)	HBu/HAc
5	2.3	0.241	0.014	5.5	0.198	2.0
10	1.2	0.831	0.021	9.5	0.413	12.5
10	2.3	0.718	0.014	5.4	0.287	6.4
30	2.3	0.624	0.022	21.5	0.240	3.8

H_{\max} – maksymalna ilość wodoru, R_{\max} – maksymalna szybkość produkcji wodoru, λ – czas indukcji, Y – wydajność substratowa

Przy zastosowaniu 30 g/l gliceryny, jej zużycie wynosiło 17 g/l i stanowiło maksymalną wartość przemiany gliceryny w badanym procesie.

Głównymi ciekłymi metabolitami w tym układzie były: 1,3-propanodiol, kwas masłowy, kwas octowy, kwas mlekowy i etanol. Największy udział wśród metabolitów uzyskano dla 1,3-PD (31%) i kwasu mlekowego (29%). 1,3-DL jest bardzo pożądanym związkiem ponieważ wykorzystuje się go w produkcji różnego rodzaju tworzyw sztucznych, m.in. poliuretanów. Natomiast kwas mlekowy znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

Wielu badaczy dowodzi, że stosunek kwasu masłowego do octowego (HBu/HAc) jest czynnikiem wpływającym na wydajność produkcji wodoru [34]. Zmiana wartości tego

stosunku wskazuje na zmianę metabolizmu mikroorganizmów [35]. Badania pokazują, że produkcja wodoru jest wyższa gdy w układzie przeważa kwas masłowy. W naszej pracy wartości H₂/HAc, wyznaczone jako stosunek stężeń tych kwasów na końcu procesu, zmieniają się w szerokim zakresie od 12.5 do 0.5 g/l a jego maksymalna wartość odpowiada najwyższej wydajności produkcji wodoru (0.41 mola H₂/mol gliceryny).

Podsumowując:

- mikroorganizmy znajdujące się w osadzie fermentacyjnym efektywnie produkują wodór z gliceryny w procesie ciemnej fermentacji
- maksymalna produkcja wodoru wynosiła 0.83 l H₂/l medium przy stężeniu gliceryny 10 g/l i inokulum 1.2 g VS/l (układ standardowy 1.2 l H₂/l medium)
- zawartość wodoru w biogazie wynosiła 51%
- dla wyższych stężeń substratu (30 g/l) maksymalne zużycie gliceryny w badanym układzie wynosi 17 g/l
- głównymi ciekłymi metabolitami procesu są cenne produkty jak 1,3-propanodiol (31%), kwas mlekowy (29%) a także kwas masłowy (23%), kwas octowy (8.5%) i etanol (7.5%).

2.3. Ściek gorzelniany

Ściek gorzelniany powstaje w wyniku przetwarzania zbóż do alkoholu etylowego. Jest to mieszanina wszystkich składników rozpuszczalnych, zawartych w ziarnie, pozostających po oddzieleniu skrobi. W Polsce produkuje się około 90-100 milionów litrów spirytusu rocznie, co powoduje, że co roku powstaje około 100 milionów litrów ścieków gorzelnianych. Część tych ścieków można zagospodarować już po niewielkiej obróbce. Odsączony wywar można wykorzystywać do produkcji pasz. Jednak pozostała frakcja płynna stanowi duże obciążenie dla środowiska. Jednym ze sposobów wykorzystania tej frakcji jest zastosowanie jej jako substratu do wytwarzania wodoru metodą ciemnej fermentacji.

W pracy (H4) przebadano różne rozcieńczenia ścieku gorzelnianego (20 i 40% v/v) produkowanego z kukurydzy oraz różne stężenia inokulum (osad fermentacyjny 10, 15, 25% v/v) i wpływ początkowego pH medium reakcyjnego (5,5; 6,0 i 4.6-4.8) na produkcję wodoru w procesie ciemnej fermentacji. Badania prowadzono w systemie okresowym przez 72 h, a pomiary metabolitów wykonywano co 6 godzin.

Najwyższą wydajność specyficzną (0.3 l H₂/g VS) uzyskano przy zastosowaniu 10% v/v inokulum i 20% v/v ścieku. Natomiast maksymalną ilość a także szybkość generowania wodoru oraz procentową zawartość wodoru w biogazie otrzymano przy zastosowaniu 40% v/v ścieku i 25% v/v inokulum (tabela 5).

Brak korekcji początkowego pH (ok. 4.6) prowadził do przeszło trzykrotnego spadku ilości wydzielanego wodoru (od 1.0 do 0.27 l/l) i prawie czterokrotnego spadku wydajności specyficznej (od 0.16 do 0.04 l H₂/g VS) oraz znacznego wydłużenia czasu indukcji (od 8.8 do 17 h).

Przy początkowym pH medium wynoszącym 5.5 uzyskano maksymalną ilość wydzielonego wodoru: 1.0 l H₂/l medium, przy szybkości produkcji równej 0,12 l H₂/l/h oraz wydajności specyficznej równej 0,16 l H₂/g VS.

Gdy początkowe pH wynosiło 6.0 obserwowano podobne parametry kinetyczne oraz zmianę metabolizmu mikroorganizmów w kierunku produkcji kwasu masłowego, którego powstawało prawie dwukrotnie więcej.

Tabela 5. Zestawienie parametrów procesu ciemnej fermentacji dla różnych stężeń ścieku gorzelnianego (pH 5.5, stężenie inokulum 25% v/v)

Parametry					
Stężenie ścieku [%v/v]	20	20	40	40	40
Stężenie inokulum [%v/v]	10	25	25	25	25
Początkowe pH	5.5	5.5	5.5	6.0	4.6
Ilość wodoru [l/l medium]	0.77	0.622	1.00	1.05	0.28
Wydajność produkcji wodoru [l H ₂ /g ΔCHZT]	0.2	0.18	0.18	0.19	0.05
Szybkość prod. H ₂ [l/l/h]	0.1	0.050	0.122	0.084	0.035
Czas indukcji [h]	12.6	14.2	12.1	8.8	16.9
udział H ₂ w biogazie [%]	50.7	60.0	62.6	61.8	65.1
Wydaj. specyficzna Y [l H ₂ /g VS]	0.306	0.097	0.156	0.164	0.045
ΔCHZT ogólne [gO ₂ /l]	3.9	3.9	5.5	5.5	5.5
ΔCHZT w roztworze [gO ₂ /l]	4.0	4.0	7	7	7

Zawartość wodoru w biogazie wynosiła około 62% dla wszystkich badanych układów. Analiza metabolitów ciekłych wykazała obecność kwasu masłowego i octowego oraz śladową ilość etanolu i kwasu propionowego. Stwierdzono, że im wyższy stosunek stężeń H₂Bu/H₂Ac tym wyższa specyficzna wydajność produkcji wodoru. Natomiast zawartość obu tych kwasów w końcowych metabolitach jest zależna od początkowego pH badanego układu i stężenia wprowadzonego ścieku.

Uzyskane w naszych badaniach wydajności i szybkości produkcji wodoru dowodzą, że ściek gorzelniany z kukurydzy jest efektywnym substratem do produkcji wodoru w procesie ciemnej fermentacji.

Podsumowując:

- ściek gorzelniany wymagał rozcieńczenia do 40% v/v
- maksymalna produkcja wodoru wynosiła 1.0 l H₂/l medium (1.2 l H₂/l medium dla układu standardowego na glukozie)
- brak korekcji początkowego pH do pH 5.5 obniżał ilość produkowanego wodoru o przeszło 70%
- maksymalny ubytek CHZT wynosił około 20%
- zawartość wodoru w biogazie wynosiła 62%.

2.4. Immobilizacja bakterii

Poszukując sposobów na podwyższenie wydajności produkcji wodoru zastosowano immobilizację bakterii na matrycy. Matrycami mogą być różnorodne materiały (szkło, wiskoza, żele, proszki), które różnią się od siebie powierzchnią właściwą, wielkością porów, właściwościami chemicznymi a także sposobem immobilizacji. W przedstawianej pracy (**H6**) zastosowano matrycę proszkową w postaci mezoporowatej krzemionki SBA-15 modyfikowanej jonami $-\text{NH}_2$, Al^{3+} , $-\text{SO}_3\text{H}$. Celem tych modyfikacji była zmiana struktury powierzchni kwasowo-zasadowej nośnika.

Do tej pory ukazała się tylko jedna praca: Mohan et.al. [36] opisująca zastosowanie SBA-15 jako matrycy do biologicznej produkcji wodoru z bardzo dobrą wydajnością. Dlatego też postanowiono sprawdzić czy materiał ten można wykorzystać w naszych badaniach.

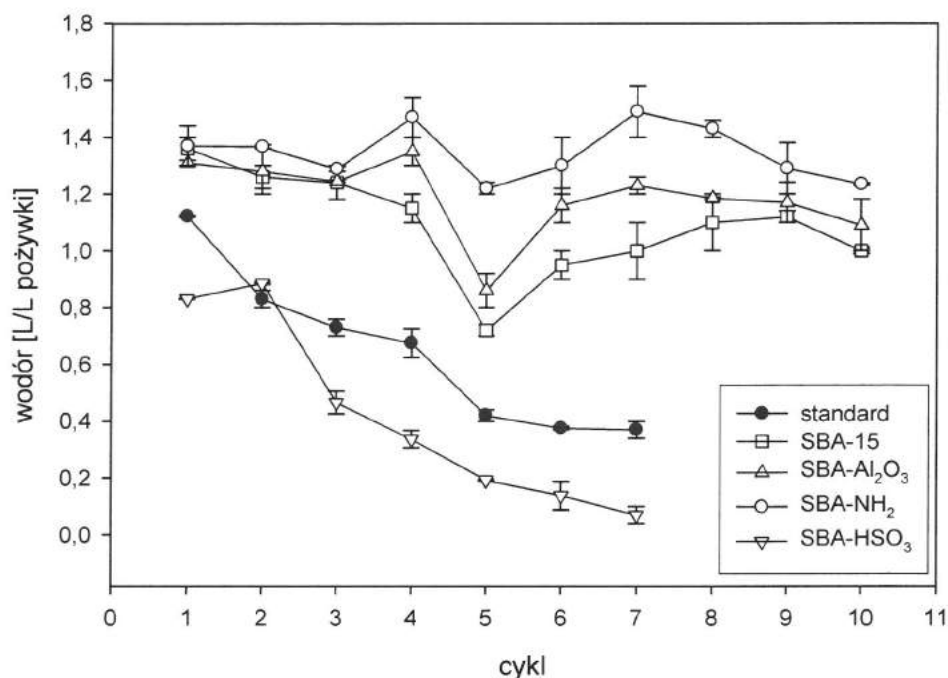
Do immobilizacji użyto mieszaną kulturę bakterii pochodzącą z osadu fermentacyjnego. Przebadano wpływ stężenia inokulum (od 10 do 45 % v/v) i stężenia SBA-15 (0,12; 0,24; 0,5; 5,0 g/l) oraz temperatury reakcji (27, 36, 42°C) na wydajność procesu ciemnej fermentacji przy produkcji wodoru. Proces prowadzono w 7 – 10 cyklach w systemie półciągłym, gdzie po każdym 48 godzinach cyklu wymieniano całą pożywkę na świeżą. W efekcie zaobserwowano prawie 35% wzrost ilości wyprodukowanego wodoru w próbach zawierających matrycę z SBA-15 modyfikowanym $-\text{NH}_2$ i 22% wzrost przy SBA-15- Al_2O_3 oraz 9% wzrost w próbach z niemodyfikowanym SBA-15, w porównaniu do standardu bez matrycy.

Tabela 6. Zestawienie średnich wyników badań produkcji wodoru dla różnych matryc

próba	H ₂ [ml/l pożywki]	Wydajność specyficzna [l H ₂ /g glukozy]	Wydajność [%]	Zużycie glukozy [%]
Standard*	1014	0.145	26.7	85
SBA-15	1100	0.157	29.1	71
SBA-15-SO ₃ H	532	0.076	14.1	45
SBA-15-Al ₂ O ₃	1235	0.176	32.6	79
SBA-15-NH ₂	1360	0.194	35.9	88

*Standard zawierał glukozę (7g/l)

Zastosowane matryce gwarantowały stabilność procesu utrzymując ilość produkowanego wodoru na stałym poziomie przez długi okres czasu (10 trydniowych cykli), w przeciwieństwie do prób standardowych prowadzonych w suspensji (bez matrycy). Nawet podwyższenie temperatury w trakcie procesu z 36 °C do 52°C (w 5 cyklu) powodowało tylko chwilowe obniżenie ilości wytwarzanego wodoru po czym bakterie wracały do swojej początkowej aktywności. Mikroorganizmy we wszystkich układach tworzyły aktywny biofilm na powierzchni matrycy. Gdy powierzchnia materiału miała charakter zasadowy, obserwowano zwiększoną produkcję wodoru w stosunku do standardu (o 25%) i niemodyfikowanej matrycy (o 19%). W przypadku matrycy z SBA-15 modyfikowanej jonami $-\text{SO}_3\text{H}$ obserwowaliśmy spadek wydajności produkcji wodoru o ok. 50% w stosunku do standardu.



Rys. 1. Porównanie produkcji wodoru przy różnych rodzajach matryc z SBA-15. W cyklu 5 podwyższono temperaturę z 36 °C do 52°C

Podsumowując:

- modyfikowana mezoporowata krzemionka może być zastosowana jako materiał do immobilizacji bakterii w procesie ciemnej fermentacji prowadzącej do wodoru
- bakterie tworzą aktywny biofilm na powierzchni matrycy z SBA-15 i wykazują wzrost aktywności przy zastosowaniu modyfikacji grupami $-NH_2$ (w stosunku do standardu o 25% i niemodyfikowanej matrycy o 19%) lub jonami Al^{3+} (o 18% w stosunku do standardu i o 11% w stosunku do niemodyfikowanej matrycy)
- obecność miejsc zasadowych na powierzchni SBA-15 stabilizuje proces i pozwala na prowadzenie go z porównywalną wydajnością przez co najmniej miesiąc
- nośnik SBA-15 modyfikowany związkami chemicznymi, które powodują zwiększoną kwasowość powierzchni, szczególnie takimi, które zawierają centra kwasowe Brönsteda, powoduje zmniejszoną produkcję wodoru. W tym przypadku następuje spadek końcowego pH do wartości zbyt niskiej do prowadzenia procesu ciemnej fermentacji.

3. Układ hybrydowy (połączenie procesu ciemnej i jasnej fermentacji)

3.1. Wprowadzenie

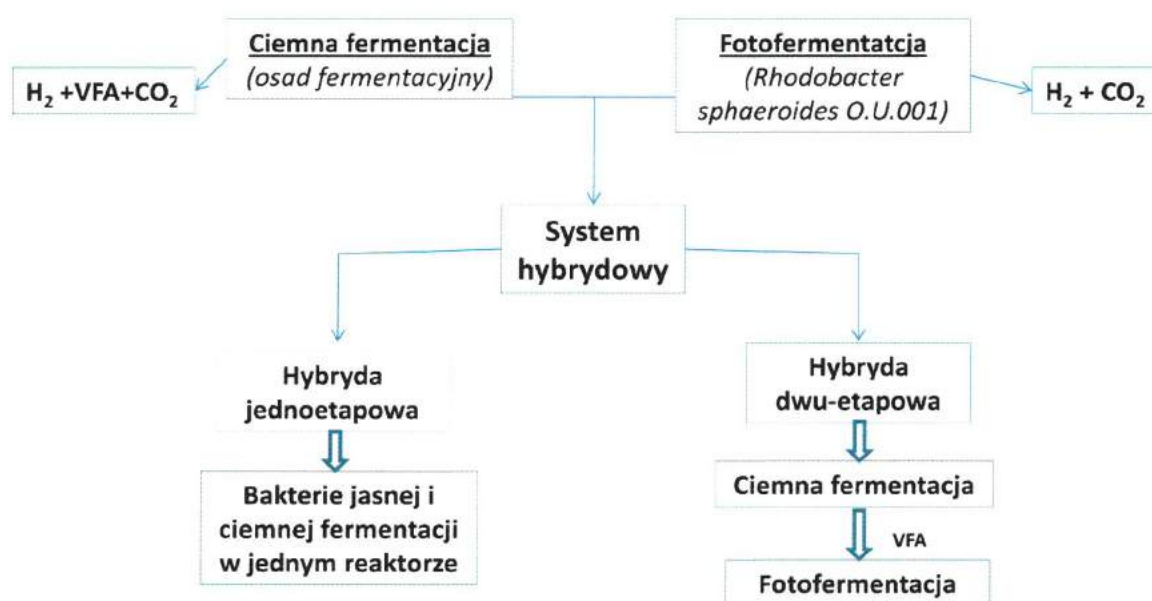
Systemy hybrydowe łączą proces ciemnej fermentacji z fotofermentacją i zwiększają produkcję wodoru i biodegradację ścieku.

Można je realizować w systemie jednoetapowym lub dwu-etapowym. System jednoetapowy polega na umieszczeniu obu kultur bakterii w jednym reaktorze, pod warunkiem, że nie konkurują one ze sobą o wykorzystanie substratu. Badania wykazują, iż

bardzo istotnym parametrem w takich układach jest synchronizacja pracy obu kultur bakteryjnych. Szybkość procesu ciemnej fermentacji jest zwykle znacznie wyższa niż fotofermentacji, która limituje szybkość całego procesu. W efekcie następuje kumulowanie w medium produktów ciemnej fermentacji, głównie lotnych kwasów tłuszczowych (VFA) i alkoholi. Duże stężenia VFA w medium, prowadzą do inhibicji substratowej [37] oraz obniżenia pH [38], co skutkuje spadkiem wydajności, bądź zahamowaniem procesu generowania wodoru. Aby wyeliminować niekorzystną różnicę szybkości reakcji, należy odpowiednio dobrać stosunek stężeń komórek różnych szczepów bakterii. Optymalne proporcje stężeń komórek, w zależności od wykorzystanych gatunków, czy substratów, wahają się od 1:4 [39] do nawet 1:600 [38]. Istotnymi zaletami jednoetapowych systemów hybrydowych są: wysoka szybkość produkcji wodoru oraz kilkukrotne zwiększenie wydajności procesu w porównaniu do procesu ciemnej fermentacji prowadzonego przez pojedynczą kulturę.

Częściej spotykana metoda polega na zastosowaniu dwóch oddzielnych reaktorów i przekazywaniu ciekłego medium, wraz z produktami ciemnej fermentacji do reaktora, w którym zachodzi fotofermentacja. Otrzymane metabolity z procesu ciemnej fermentacji mogą jednocześnie stanowić źródło węgla dla foto-heterotroficznych bakterii produkujących wodór w procesie jasnej fermentacji [20,40]. Na wydajność fotofermentacji wpływają liczne parametry (dostęp światła, odpowiedni skład pożywki, stężenie substratu, obecność jonów amonowych) dlatego też powinna ona być prowadzona w niezależnym reaktorze. Rozdzielenie procesów ciemnej i jasnej fermentacji rozszerza listę wykorzystywanych substratów organicznych. Ponadto umożliwia przeprowadzanie ciemnej fermentacji przy użyciu bakterii ekstremalnie termofilnych (wymagających temperatur powyżej 70°C) co zwiększa możliwości rozkładu trudno degradowanych związków organicznych [41-43]. Jednak podstawowym zadaniem systemów hybrydowych jest całkowita utylizacja ścieków czy odpadów oraz znaczna poprawa wydajności produkcji wodoru.

Szczegóły wyżej opisanych procesów fermentacji znajdują się w pracy przeglądowej H9.



Schemat systemu hybrydowego

3.2. Odpad z produkcji gumy do żucia

Badania prowadzono w systemie okresowym w dwóch niezależnych układach: fotofermentacji i ciemnej fermentacji. Warunki prowadzenia tych procesów były takie jak przy doświadczeniach z innymi ściekami. Jednakże odpad z produkcji gumy do żucia (proszek) przed wprowadzeniem do układów fermentacyjnych rozpuszczano w wodzie i podgrzewano w temperaturze 60°C przez 5 minut. Badania HPLC wykazały, że odpad zawierał: ksylitol (32%), gumę Talha (66%), glicerynę (0.8%), aspartam (0.3%) i ślady maltitolu.

W procesie ciemnej fermentacji zastosowano odpad w stężeniu 16, 33, 50, 67, 100 i 133 g/l i zaobserwowano znaczny ubytek gumy Talha oraz gliceryny. Zawartość głównego składnika odpadu, ksylitolu, pozostawała w pożywce prawie bez zmian. Maksymalna ilość wodoru w tym procesie produkowana była przy stężeniu 67 g odpadu/l medium i wynosiła 0.36 l/l medium (tabela 7).

W czasie procesu powstają LKT tzn., kwas octowy, masłowy, mlekowy i propionowy. Tak więc roztwór po ciemnej fermentacji, składający się z ksylitolu oraz lotnych kwasów tłuszczowych stał się odpowiednią pożywką dla bakterii prowadzących proces fotofermentacji. W taki sposób został stworzony układ hybrydowy (H7), który poprawił wydajność wytwarzania wodoru z odpadu po produkcji gumy do żucia.

Medium z procesu ciemnej fermentacji przed wprowadzeniem do układu fotofermentacyjnego wymagał co najmniej czterokrotnego rozcieńczenia. Nerozcieńczony roztwór zawierał zbyt dużą ilość jonów amonowych (480 mg NH_4^+ /l pożywki), które inhibują syntezę nitrogenazy odpowiedzialnej za produkcję wodoru.

Ostatecznie wydajność procesu w przeliczeniu na jednostkę ubytku CHZT wzrosła z 1.8 mM H_2 /g CHZT do 4.7 mM H_2 /g CHZT, natomiast wydajność substratowa w przeliczeniu na jednostkę odpadu wzrosła z 0.24 mM H_2 /g do 0.77 mM H_2 /g dla układu, w którym początkowe stężenie odpadu wynosiło 67 g/l. Całkowita ilość wytworzonego wodoru w obu etapach wynosiła 6.7 l H_2 /l nierozcieńczonego odpadu.

Tabela 7. Zestawienie wyników badań prowadzonych w systemie hybrydowym

	Ciemna fermentacja	fotofermentacja	hybryda
Maksymalna ilość H_2 [l/l pożywki]	0.36	0.78 (rozcieńczenie 1: 8)	1.14
ΔCHZT [%]	42	40	59

W tabeli 8 zebrano przykładowe maksymalne ilości wodoru uzyskane przez innych badaczy w dwuetapowych systemach hybrydowych. Biorąc pod uwagę nietypowy skład badanego przez nas odpadu, całkowita ilość wygenerowanego wodoru jest zadawalająca w porównaniu do takich substratów jak glukoza czy sacharoza.

Tabela 8. Wybrane substraty w dwuetapowych systemach hybrydowych

Szczep prowadzący ciemną fermentację	Szczep prowadzący fotofermentację	Nazwa ścieku/surowca	Główny substrat ciemnej fermentacji	Główny substrat fotofermentacji	Max H ₂	Źródło
mieszana kultura bakteryjna	<i>Rhodospseudomonas palustris</i> DSM 127	serwatka + L-kwas jabłkowy	laktoza	octan, izomaślan, mleczan, jabłczan	0.44 l/g CHZT	[41]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	<i>Rhodospseudomonas palustris</i> , <i>Rhodobacter capsulatus</i>	melasa z buraków cukrowych	sacharoza	octan, mleczan, etanol	3 l/l	[42]
Mieszana kultura bakteryjna	<i>Rhodobacter capsulatus</i> B10	skrobia ziemniaczana	glukoza	mleczan, octan, maślan	7.9 l/l	[44]
Mieszana kultura bakteryjna	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	skrobia manioku	glukoza	octan, mleczan	0.24 l/g skrobi	[45]
<i>Clostridium butyricum</i> IFO13949, <i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> M-19	odpad produkcji skrobi z batatów	glukoza	octan, maślan, mleczan	7 mol H ₂ /mol glukozy	[46]
Mieszana kultura bakteryjna	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	skrobia pszeniczna	glukoza	lotne kwasy tłuszczowe (VFA)	4,55 [mol H ₂ /mol glukozy]	[47]
Mieszana kultura bakteryjna	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001	Odpad z produkcji gumy do żucia	Gliceryna, guma Talha	Ksylitol, VFA	6.7 l/l	[H7]

Podsumowując:

- odpad w postaci proszku przed wprowadzeniem do układów fermentacyjnych wymagał rozpuszczenia w wodzie w temperaturze 60°C
- maksymalną ilość wodoru w procesie fotofermentacji (0.78 l/l pożywki) uzyskano przy 8-krotnym rozcieńczeniu medium po procesie ciemnej fermentacji
- w systemie hybrydowym udało się rozłożyć wszystkie główne składniki organiczne odpadu i przeszło 3-krotnie zwiększyć ilość produkowanego wodoru (1.15 l H₂/l pożywki) w stosunku do procesu ciemnej fermentacji (0.36 l H₂/l pożywki)
- całkowity ubytek CHZT po procesie prowadzonym w systemie hybrydowym wynosił 59%.

III. Podsumowanie

Na podstawie przedstawionego przeglądu eksperymentów wykonanych na bazie ścieków spożywczych należy stwierdzić, że są one efektywnym substratem w procesach fermentacji prowadzących do wytworzenia wodoru.

Oprócz opracowania optymalnych parametrów takich jak: pH, temperatura, stężenie substratów, stosunek C/N, szybkość przepływu medium dla procesów ciemnej i jasnej fermentacji, zaprojektowano system, w którym połączono obydwa procesy w celu uzyskania wysokich wydajności wytwarzania wodoru i poprawienia stopnia utylizacji ścieków a zatem znacznego poprawienia bilansu ekonomicznego całego procesu. Stworzenie takich układów

hybrydowych może stać się doskonałym rozwiązaniem do opracowania technologii produkcji biowodoru na skalę przemysłową.

Zastosowano różne materiały immobilizujące, które pozwoliły na prowadzenie procesów fermentacji w systemie ciągłym lub półciągłym i znaczne wydłużenie pracy immobilizowanych komórek bakteryjnych. Można stwierdzić, że zastosowany przez nas modyfikowany SBA-15 pozwalający na tworzenie przez mikroorganizmy na swojej powierzchni trwałych biofilmów a także zachowujący ich aktywność przez długi czas, to materiał nowatorski w tej dziedzinie .

Dużym osiągnięciem tych badań jest nie tylko optymalizacja badanych procesów prowadząca do uzyskania wysokich wydajności porównywalnych do standardu lecz przede wszystkim całkowite rozłożenie materiału organicznego zawartego w ścieku.

Obecnie prowadzone przeze mnie prace skupiają się na odpowiednim przygotowaniu trudno biodegradowalnej materii organicznej takiej jak celuloza czy lignoceluloza (zawartych w ściekach z przemysłu rolno-spożywczego i papierniczego), a także na hodowli i adaptacji bakterii do podłoża reakcyjnego oraz stworzeniu kulturom bakteryjnym odpowiednich warunków do utylizacji odpadów organicznych w procesie fermentacji prowadzącej do otrzymania wodoru.

Literatura

- [1] Ball M, Wietschel M. The future of hydrogen – opportunities and challenges, *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:615-627
- [2] Momirlan M, Veziroglu TN. Current status of hydrogen energy, *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 2002;6:141-179
- [3] Manish S, Banerjee R. Comparison of biohydrogen production processes, *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33:279 – 286
- [4] Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies, *Catalysis Today* 2009;139:244-260
- [5] Kovács KL, Maróti G, Rákhely G. A novel approach for biohydrogen production, *Int J Hydrogen Energy* 2006;31:1460 - 1468
- [6] Hallenbeck PC, Ghosh D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Cell, Trends in Biotechnology* 2009; 27:287-297
- [7] Basak N, Das D. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production : the present state of the art, *World J Microbiol Biotechnol* 2007; 23: 31-42.
- [8] Levin DB, Pitt L, Love M, Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application, *Int J Hydrogen Energy* 2004;29:173 – 185
- [9] Kapdan I.K, Kargi F, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme and Microbial Technology* 2006;38:569-582
- [10] United States Department of Energy. An integrated research, development and demonstration plan. *Hydrogen Pasteur Plan* 2010.
- [11] Kovács K.L, Maróti G, Rákhely G, A novel approach for biohydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy* 2006;31:1460 - 1468
- [12] Abed R.M.M, Dobretsov S, Sudesh K, Applications of cyanobacteria in biotechnology, *Journal of Applied Microbiology* 2009;106:1-12

- [13] Hallenbeck P.C, Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis, *International Journal of Hydrogen Energy* 2009;34:7379-7389.
- [14] Kotay S.M, Das D, Biohydrogen as a renewable energy resource – Prospects and potentials, *Int J Hydrogen Energy*, 2008;33:258-263.
- [15] Bockris J.O.M, The hydrogen economy: Its history, *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:2579-2588.
- [16] Yetis M, Gunduz U, Eroglu I, Yucel M, Turker L, Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides O.U.001*. *Int J Hydrogen Energy*, 2000;25:1035-41
- [17] Turkarlan S, Yigit DO, Aslan K, Eroglu I, Gunduz U, Photobiological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* by utilization of waste water from milk industry. In: Zaborsky OR, editor. *Biohydrogen*. New York: Plenum Press, 1998, p 151-6.
- [18] Zhu H, Suzuki T, Tsygankov AA, Asada Y, Miyake J, Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. *Int J Hydrogen Energy*, 1999;24:305-10
- [19] Wang X, Zhao Y, A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *Int J Hydrogen Energy*, 2009;34:245-254.
- [20] Argun H, Kargi F, Kapdan I.K, Light fermentation of dark fermentation effluent for bio-hydrogen production by different *Rhodobacter* species at different initial volatile fatty acid (VFA) concentration. *Int J Hydrogen Energy*, 2008;33:7405-7412
- [21] Uyar B, Eroglu I, Yucel M, Gunduz U, Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents. *Int J Hydrogen Energy*, 2009;34:4517-4523.
- [22] Mohan S.V, Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. *Int J Hydrogen Energy*, 2009;34:7460-7474
- [23] Li X, Wang Y, Zhang S, Chu J, Zhang M, Huang M, Enhancement of phototrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides ZX-5* using a novel strategy – shaking and extra-light supplementation approach. *Int J Hydrogen Energy*, 2009;34:9677-9685
- [24] Reungsang A, Sittijunda S, O-thong S, Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate, *Int J Hydrogen Energy*, 2013;38:6970-6979.
- [25] Han J, Lee D, Cho J, Lee J, Kim S, Hydrogen production from biodiesel byproduct by immobilized *Enterobacter aerogenes*. *Bioprocess Biosyst Eng* 2012;35:151-157
- [26] Zhang Ch, Zhu X, Liao Q, Wang Y, Li J, Ding Y, Wang H, Performance of a groove-type photobioreactor for hydrogen production by immobilized photosynthetic bacteria. *Int J Hydrogen Energy*, 2010;35:5284-5292.
- [27] Rees D.C, Tezcan F.A, Haynes C.A, Walton M.Y, Andrade S, Einsle O, Howard J.B, Structural basis of biological nitrogen fixation, *Philosophical Transaction of Royal Society A*, 2005;363:971-984.
- [28] Kim S.H, Chung J.H, Kim Y.T, Han J., Yoon S.P, Namb S-W, Lim T-H, Lee H-I,

- Disk-type porous Ni–Cr bulk catalyst for hydrogen production by autothermal reforming of methane, *Catalysis Today*, 2009;146:96-102.
- [29] Santos D, Madeira L, Passos F.B, The effect of the addition of Y₂O₃ to Ni/ α -Al₂O₃ catalysts on the auto thermal reforming of methane, *Catalysis Today*, 2010;149:401-406.
- [30] Hallenback P.C, Benemann J.R, Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes, *Int J Hydrogen Energy*, 2002;27:1185-1193.
- [31] Nath K, Muthukumar M, Kumar A, Das D, Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:1195-1203.
- [32] Argun H, Kargi F, Kapdan I.K, Effects of the substrate and cell concentration on bio-hydrogen production from ground wheat by combined dark and photo-fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:6181-6188
- [33] Wang X, Monis P.T, Saint C.P, Jin B, Biochemical kinetics of fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* W5. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:791-798.
- [34] Hawkes F.R, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes D.L, Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic micro flora: Principles and progress. *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:172-184.
- [35] Khanal S.K, Chen W.H, Li L, Sung S, Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int J Hydrogen Energy* 2004;29:1123-1131.
- [36] Mohan SV, Mohanakrishna G, Reddy SS, Raju BD, Rao KSR, Sarma PN, Self-immobilization of acidogenic mixed consortia on mesoporous material (SBA-15) and activated carbon to enhance fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:6133-42
- [37] Kargi F, Ozmihci S, Effects of dark/light bacteria ratio on bio-hydrogen production by combined fed-batch fermentation of ground wheat starch, *Biomass and bioenergy* 2010;34:869–874
- [38] Liu B-F, Ren N-Q, Tang J, Ding J, Liu W-Z, Xu J-F, Cao G-L, Guo W-Q, Xie G-J, Bio-hydrogen production by mixed culture of photo- and dark-fermentation bacteria, *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:2858 – 2862
- [39] Argun H, Kargi F, Bio-hydrogen production from Grodnu wheat starch by continuous combined fermentation using annular-hybrid bioreaktor, *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:6170 – 6178
- [40] Redwood M.D, Macaskie L.E, A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *Int J Hydrogen Energy* 2006;31:1514-1521
- [41] Azbar N, Centinkaya Dokgoz F.T, The effect of dilution and L-malic acid addition on bio-hydrogen production with *Rhodospseudomonas palustris* from effluent of an acidogenic anaerobic reactor, *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:5028 – 5033
- [42] Ozgur E, Mars A. E, Peksel B, Louwerse A, Yucel M, Gunduz U, Claassen P.A.M, Eroglu I, Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:511 – 517
- [43] Shin H.S, Youn J.H, Kim S.H, Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy* 2004;29:1355-1363.
- [44] Laurinavichene T.V, Belokopytov B.F, Laurinavichius K.S, Tekucheva D.N, Seibert

- M, Tsygankov A.A. Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 3. Potato as substrate for sequential dark fermentation and light-driven H₂ production, *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:8536–8543
- [45] Su H, Cheng J, Zhou J, Song W, Cen K. Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:1780-1789.
- [46] Yokoi H, Saitsu A, Uchida H, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y, Microbial Hydrogen Production from Sweet Potato Starch Residue, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2001;91:58–63
- [47] Argun H, Kargi F, Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of ground wheat solution: Effects of light source and light intensity, *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:1595–1603

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych oraz dalsze plany badawcze

Szczegółowe dane dotyczące opublikowanych prac, komunikatów, projektów badawczych, nagród i pracy dydaktycznej znajdują się w **załączniku 3**

3.1. Krótka charakterystyka tematyki pozostałych badań naukowych

Poza tematem pracy habilitacyjnej zajmowałam się także szeroko pojętą chemią środowiska. Prace te dotyczyły badań nad biologicznymi procesami denitryfikacji i desulfurykacji. Celem tych prac było wyznaczenie optymalnych warunków procesów, określenie stężeń granicznych substancji takich jak: surfaktanty, pyły kominowe, metale ciężkie oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych procesów. Z tej tematyki jestem współautorem 26 prac naukowych i 8 komunikatów oraz pracy doktorskiej obronionej w 2003 roku.

Obecnie pracuję nad wykorzystaniem trudno degradowanych substancji (celuloza, lignoceluloza) w procesach fermentacji prowadzącej do produkcji wodoru. Łączy się to z zaprojektowaniem bioreaktorów pracujących w systemie ciągłym oraz zbudowaniem bioreaktora hybrydowego, który połączy procesy ciemnej fermentacji i fotofermentacji w jeden układ (projekt badawczy: Integracja ciemnej fermentacji i fotofermentacji w ciągłych procesach biologicznej produkcji wodoru z udziałem substratów wielkocząsteczkowych, termin realizacji od 17 kwietnia 2018 do kwietnia 2021 roku).

Systemy takie są wstępem do opracowania układów pracujących w większej skali, umożliwiających przeprowadzenie wydajnych procesów produkujących wodór z różnorodnych odpadów.

Efektom moich ostatnich badań jest przygotowanie do opublikowania dwóch prac: „Biohydrogen production from distillery wastewater in a two-step process of dark fermentation and photofermentation.” oraz „Direct fermentative hydrogen production from cellulose with enriched mesophilic bacterial consortia”, które zostały wysłane do *Renewable Energy* (IF 4,357).

Pierwsza z nich dotyczy wykorzystania ścieku gorzelnianego do produkcji wodoru w procesie fermentacji, fotofermentacji i w połączeniu obu tych procesów. Dokonuję tu porównania czterech ścieków gorzelnianych różniących się głównym substratem produkcji alkoholu (pszenica, kukurydza) oraz etapem poboru ścieku (po pierwszej destylacji, kondensat po dekantacji) co do tej pory nie było tematem prac poświęconych wykorzystaniu ścieków w produkcji wodoru. Ponadto wykazuję, że zastosowanie układu hybrydowego do produkcji wodoru znacznie poprawia wydajność procesu i co równie ważne całkowicie degradowuje ładunek organiczny zawarty w ścieku.

Drużga praca dotyczy produkcji wodoru ze skrobi i celulozy przy zastosowaniu bakterii z osadu fermentacyjnego. Przeprowadzono tu wstępną termiczną obróbkę inokulum co umożliwiło prowadzenie procesu w systemie okresowym (batch) przez długi czas (40-160 dni) i uzyskanie ciągłej i stabilnej produkcji wodoru.

Ponadto pracuję nad wykorzystaniem drukarki 3D do stworzenia przestrzennej matrycy z celulozy o odpowiednich porach do immobilizowania bakterii. Matryce te będą wykorzystywane do produkcji wodoru w systemie ciągłym.

W ramach programu „Wolontariat studencki” prowadzę prace nad wykorzystaniem suchych, zmielonych liści jako substratu do produkcji wodoru w procesie ciemnej fermentacji przy wykorzystaniu osadu fermentacyjnego jako źródła mikroorganizmów. Ponadto, wykorzystuję do tego celu także bakterie wyizolowane przez nas z osadu fermentacyjnego i przystosowane do pracy na pożywce skrobiowej.

