

Roman Zagrodnik – rozprawa doktorska

"Immobilizowane kultury bakteryjne do produkcji wodoru w fermentacyjnych procesach ciągłych"

Energia zawsze pozostawała elementem koniecznym do szybkiego rozwoju społecznego, a wraz z rozwojem nowoczesnej cywilizacji poziom jej zużycia dramatycznie wzrasta. Ponad 80% obecnie wytwarzanej energii pochodzi z paliw kopalnych, które posiadają wiele użytecznych właściwości, co uczyniło je popularnymi w ostatnim stuleciu. Ich zasoby są jednak ograniczone i szybko zużywane. Dodatkowo koszt uzyskania energii z tradycyjnych źródeł wzrasta w sposób trudny do przewidzenia. Dlatego też poszukuje się nowych technologii otrzymywania energii. Odpowiedzią na powyższe problemy jest wykorzystanie odnawialnych źródeł energii, takich jak biomasa, energia Słońca, wody, wiatru, czy energii geotermalnej.

Jednak niezależnie od źródła pochodzenia, energia musi dotrzeć do użytkownika poprzez wydajny nośnik, który może być wykorzystany w szerokiej gamie zastosowań. Uważa się, że szczególnie korzystnym nośnikiem energii i "paliwem przyszłości" może być wodór. Wodór jest czystym i wydajnym paliwem i jest powszechnie uznawany jako potencjalny substytut paliw kopalnych. Posiada on najwyższą energię spalania spośród znanych paliw, a jedynym "popiołem" jest woda. Niestety, przemysłowe otrzymywanie wodoru jest obecnie oparte w 98% właśnie na paliwach kopalnych.

Spośród wielu metod generowania wodoru, wodór wytwarzany przez mikroorganizmy wydaje się atrakcyjną alternatywą. Biologiczne procesy produkcji wodoru, w przeciwieństwie do ich chemicznych i elektrochemicznych odpowiedników, prowadzone są w środowisku wodnym w temperaturze otoczenia i przy ciśnieniu atmosferycznym. Wiele procesów biologicznych jest w stanie wykorzystywać energię słoneczną do produkcji wodoru. Ponadto możliwe jest wykorzystanie szerokiego zakresu substancji organicznych, w tym biomasy odpadowej. Procesy te spełniają więc podwójną funkcję – przetwarzania odpadów z jednoczesną produkcją energii. Problemem jest jednak opracowanie procesu opłacalnego i możliwego do wdrożenia w dużej skali. Dlatego obecnie wysiłki koncentrują się na budowie nowych bioreaktorów, w których namnożone bakterie mogłyby produkować wodór. Ponadto zastosowanie techniki immobilizacji daje możliwość osiągnięcia wysokiego stężenia komórek na jednostkę objętości bioreaktora, a jednocześnie pozwala prowadzić proces w sposób ciągły, co jest pożądane w produkcji przemysłowej. Nie bez znaczenia jest także możliwość integracji procesów biologicznego wytwarzania wodoru poprzez wykorzystanie kilku metod jednocześnie w celu lepszego wykorzystania substratu i zwiększenia wydajności produkcji wodoru.

Ciemna fermentacja pozwala na wykorzystanie szerokiego zakresu substancji organicznych, w tym złożonej biomasy jak ścieki i odpady, do wytwarzania wodoru oraz kwasów organicznych jako produktów ubocznych. Dlatego też maksymalna teoretyczna

wydajność produkcji  $H_2$  w tym procesie wynosi 4 mole  $H_2/mol_{glukozy}$ . Natomiast fotofermentacja prowadzona przez purpurowe bakterie bezsiarkowe pozwala wykorzystać produkty uboczne ciemnej fermentacji (głównie kwas masłowy i octowy) do produkcji dodatkowych ilości wodoru, dzięki wykorzystaniu energii słonecznej. Połączenie tych dwóch procesów pozwoliłoby osiągać wydajności wynoszące 12 mol  $H_2/mol_{glukozy}$ . Najważniejszym wyzwaniem stojącym przed wielkoskalową produkcją wodoru tymi metodami jest zapewnienie niskich kosztów jego otrzymania i magazynowania, tak aby stał się konkurencyjny w stosunku do innych źródeł energii.

Podstawowym celem niniejszej pracy było więc zbadanie procesów ciemnej i jasnej fermentacji z określeniem zarówno metabolitów gazowych jak i ciekłych (kwasy organiczne i alkohole) i optymalizacja tych procesów tak, aby uzyskiwać maksymalną produkcję wodoru, przy maksymalnym stopniu redukcji związków organicznych zawartych w pożywce. Głównym zadaniem było stworzenie i zbadanie jednoetapowego systemu hybrydowego prowadzonego w trybie ciągłym i opartego na połączeniu procesów ciemnej i jasnej fermentacji. Dodatkowo zbadano możliwość immobilizacji mikroorganizmów na różnych nośnikach, w tym na silanizowanych szklach porowatych. Kolejnym celem było skonstruowanie nowatorskiego systemu produkcji wodoru opartego o fotobioreaktor płaskopłytkowy. Badania koncentrowały się na poznaniu wpływu podstawowych parametrów procesu takich jak: pH, temperatura, intensywność światła czy hydrauliczny czas retencji na produkcję wodoru i skład wytworzonych metabolitów ciekłych.

Mikrobiologiczna produkcja wodoru była badana w bioreaktorach o zróżnicowanej konstrukcji pracujących w różnych trybach. Stworzony został układ pozwalający na ciągłą i półciągłą produkcję wodoru dzięki wykorzystaniu synchronicznej pracy pomp perystaltycznych. Produkcja  $H_2$  przez fotofermentujące bakterie *R. sphaeroides* oraz prowadzące ciemną fermentację bakterie *C. beijerinckii* i *C. acetobutylicum* była analizowana i optymalizowana oddzielnie. Po ustaleniu optymalnych parametrów procesu stworzono układy z mieszanymi kulturami bakterii. Skład wytworzonych gazów był ustalany przy wykorzystaniu chromatografii gazowej. Ilość wytworzonej biomasy badano przy użyciu spektrofotometrii i metod wagowych. Zmiany stężeń związków organicznych w pożywce oznaczano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Wyniki wskazały, że podczas ciągłego procesu fotofermentacji najlepsze rezultaty otrzymano dla eksperymentów z silanizowanym nośnikiem szklanym, proces był bowiem prowadzony przez 70 dni do momentu zaprzestania produkcji wodoru, a jego całkowita ilość wyniosła 4,14 L. W przypadku szkieł niemodyfikowanych produkcja  $H_2$  trwała 50 dni, a jego ilość wyniosła 2,95 L. Z kolei kultury zawiesinowe wykazały najniższą ilość wytworzonego wodoru (2,39 L). Dodatkowo immobilizacja bakterii doprowadziła do zwiększenia wydajności konwersji substratu. Zastosowanie szkła porowatego modyfikowanego 3-(2-aminoetyloaminopropyl)trimetoksyloksysilanem pozwoliło na zwiększenie akumulacji bakterii wewnątrz bioreaktora, co doprowadziło do podniesienia wydajności procesu.

Dodatkowo w układach ciągłych uzyskiwano większe ilości wodoru niż w procesach półciągłych.

Eksperymenty wskazały, że połączenie ciemnej i jasnej fermentacji skutkowało zwiększeniem ilości produkowanego wodoru. Wymagało to jednak ścisłej kontroli parametrów procesu. Procesy hybrydowe są bowiem bardziej wrażliwe na zmiany warunków w bioreaktorze niż procesy z czystymi szczepami bakteryjnymi. Bakterie *C. acetobutylicum* okazały się być lepszym kandydatem do procesów hybrydowych niż *C. beijerinckii*. Wynikało to z wyższej produkcji wodoru, braku wrażliwości na światło, a także zdolności utylizacji złożonych substratów takich jak skrobia. Badania optymalizacyjne wskazały, że warunki pH mają kluczowe znaczenie dla hybrydowego procesu produkcji wodoru, dlatego zaprojektowano i skonstruowano system pozwalający na automatyczną kontrolę pH w bioreaktorze. Optymalne kontrolowane pH dla produkcji wodoru z glukozy przez pojedyncze kultury *C. acetobutylicum* oraz *R. sphaeroides* wynosiło odpowiednio 5,5 oraz 7,5. Jednak stworzenie wydajnego systemu hybrydowego wymagało zastosowania kontrolowanego pH 7,0, co zapewniło wysoką produkcję wodoru przez oba gatunki bakterii. Przy niższych wartościach pH dominowały bakterie *C. acetobutylicum*, a przy wyższych zachodził jedynie proces fotofermentacji. Z stworzonych układach hybrydowych kwasy organiczne będące produktem ciemnej fermentacji były wykorzystywane przez bakterie fotofermentujące, doprowadzając do całkowitej konwersji substratu do wodoru i CO<sub>2</sub>. Zbliżone wyniki otrzymano dla skrobi jako substratu. Jednak aktywacja bakterii *C. acetobutylicum* na skrobi okazała się być kluczowa dla otrzymania wysokiej aktywności bakterii zarówno w procesie z pojedynczą jak i łączoną kulturą bakteryjną.

Optymalizacja procesów okresowych pozwoliła na przeprowadzenie jednoetapowych ciągłych procesów hybrydowych przy kontrolowanym pH 7,0. Pozwoliło to wydajnie produkować wodór ze skrobi w pierwszych dniach. Jednak ze względu na różnice w wymaganiach pH dla zastosowanych bakterii, produkcja wodoru zakończyła się po 16 dniach. Przeprowadzone badania dostarczyły cennych informacji, a otrzymane wyniki mogą być użyte do stworzenia układów biologicznej produkcji wodoru w większej skali. Dalsze badania powinny skupiać się na znalezieniu bakterii ze zbliżonymi wymaganiami pH, tak aby możliwe było stworzenie stabilnego ciągłego systemu hybrydowego.