



Notkun efnarafals með aðstoð brennisteinsbaktería til hagnýtingar brennisteinsvetnis af háhitasvæðum

Einar Daði Lárusson



**Raunvísindadeild
Háskóli Íslands
2015**

Notkun efnarafals með aðstoð brennisteinsbaktería til hagnýtingar brennisteinsvetnis af háhitasvæðum

Einar Daði Lárusson

15 eininga ritgerð sem er hluti af
Baccalaureus Scientiarum gráðu í lífefnafræði

Leiðbeinendur
Sigurður Brynjólfsson
Bjarni Ásgeirsson

Raunvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Reykjavík, október 2015

Notkun efnarafals með aðstoð brennisteinsbaktería til hagnýtingar brennisteinsvetnis af háhitasvæðum

Hagnýting brennisteinsvetnis með aðstoð baktería

15 eininga ritgerð sem er hluti af *Baccalaureus Scientiarum* gráðu í lífefnafræði

Höfundarréttur © 2015 Einar Daði Lárusson

Öll réttindi áskilin

Raunvísindadeild

Verkfræði- og náttúruvísindasvið

Háskóli Íslands

Hjarðarhagi 2-6

107 Reykjavík

Sími: 525 4000

Skráningarupplýsingar:

Einar Daði Lárusson, 2015, *Notkun efnarafals með aðstoð brennisteinsbaktería til hagnýtingar brennisteinsvetnis af háhitasvæðum*, BS ritgerð, Raunvísindadeild, Háskóli Íslands, 38 bls.

Prentun: Háskólaprent

Reykjavík, september 2015

Útdráttur

Ný þekking á sviði örveruhvataðra efnarafla var nýtt til að hagnýta úrgangsefni jarðvarmavirkjunar á Íslandi. Bakterían *Desulfobulbus propionicus* getur andað með aðstoð rafskauts sem rafeindaþega og á sama tíma nýtt brennistein sem rafeindagjafa. Kannað var hvort bakterían væri í efnarafli fær um að nota brennistein sem kominn var frá brennisteinsvetni úr úrgangsvatni Hellisheiðarvirkjunar sem rafeindagjafa og færa rafeindir yfir á rafskaut. Á þann hátt má nýta orkuna sem felst í eitruðum úrgangsefnum líkt og brennisteinsvetni. Um leið og orkan sem býr í eitruðu brennisteinsvetni er virkjuð, er brennisteinsefninu umbreytt með oxun yfir í sulfat sem er skaðminna efni. Þetta er í fyrsta skipti sem úrgangsvatn jarðvarmavirkjunar er prófað í þessum tilgangi. Niðurstöður bentu til að bakteríunni tækist ekki að framkvæma hvarfið við þessar aðstæður. Natríum sulfíð var einnig prófað sem rafeindagjafi og virtist bakterían framkvæma hvarfið í því tilfalli. Tilraun var aðeins framkvæmd einu sinni. Endurtaka þarf rannsóknina til að staðfesta niðurstöður og í framtíðinni sigrast á þeim hindrunum sem upp koma.

Abstract

New knowledge in the field of microbial fuel cells was used to repurpose waste from a geothermal power plant in Iceland. The bacteria *Desulfobulbus propionicus* can oxidize sulfur and reduce electrodes for energy conservation. It was investigated whether the bacteria was able to use sulfur, derived from hydrogen sulfide from the wastewater of Hellisheiði geothermal power plant, as an electron donor to deliver electrons to an electrode. In this manner it is possible to use the energy hidden in toxic waste like hydrogen sulfide. Simultaneously, by harnessing the energy from hydrogen sulfide, the sulfur compound is transformed into sulfate, which is far less toxic. This is the first time that wastewater from a geothermal power plant has been tested in this manner. The results indicate that the bacteria was not successful in carrying out the reaction under the given circumstances. Sodium sulfide was also tested as an electron source, and the bacteria appeared to perform the reaction when sodium sulfide was used. The experiment was only executed once. It is necessary to perform the experiment repeatedly to verify these results and to overcome future obstacles.

Þessi ritgerð er tileinkuð ömmu minni Guðlaugu Ragnarsdóttur sem kenndi mér svo margt

Efnisyfirlit

Útdráttur	iv
Abstract	iv
Efnisyfirlit	vi
Myndaskrá	vii
Þakkir	viii
1 Inngangur	1
1.1 Jarðhitasvæði og jarðgös	1
1.2 Orkuefnaskipti	2
1.3 Efnaraflar	4
1.4 Flutningur rafeinda að rafskauti	6
1.5 Örveruhvataður rafsamruni	10
1.6 Hagnýting baktería í efnarafli	11
2 Framkvæmd rannsóknar og aðferðir	16
2.1 Bakteríuræktun	16
2.2 Súlfíðmælingar	17
2.3 Súlfatmælingar	18
2.4 Brennisteinsvetni af háhitasvæðum	20
2.5 Uppsetning efnarafals	20
3 Niðurstöður og umræða	22
3.1 Bakteríuræktun	22
3.2 Súlfíðmælingar	23
3.3 Brennisteinsvetni af háhitasvæðum	23
3.4 Súlfatmælingar	24
3.5 Mælingar á lausn efnarafals	25
4 Ályktanir og framtíð verkefnis	31
Heimildir	32
Fylgiskjöl	35

Myndaskrá

Mynd 1. Hlutfall gasa frá jarðvarmavirkjunum á Hellsheiði og Nesjavöllum.....	12
Mynd 2. Uppsetning efnarafals.	21
Mynd 3. Dæmi um vaxtarkúrfu <i>D. propionicus</i>	22
Mynd 4. Staðalkúrfa súlfíðmælinga.	23
Mynd 5. Fyrri staðalkúrfa súlfatmælinga.	24
Mynd 6. Seinni staðalkúrfa súlfatmælinga.	24
Mynd 7. Súlfíðmagn í efnarafli með bakteríu og natríum súlfíð innspýtingu.....	25
Mynd 8. Súlfíðmagn í efnarafli með bakteríu og virkjunarvatni.	26
Mynd 9. Súlfatstyrkur kerfis með bakteríu og Na ₂ S sem súlfíðgjafa.....	26
Mynd 10. Súlfatstyrkur kerfis með bakteríu og virkjunarvatn sem súlfíðgjafa.	27
Mynd 11. Mældur súlfíðstyrkur og súlfatstyrkur viðmiðunarkeyrslu með natríum súlfíði.	28
Mynd 12. Samanburður á anóðuklefum efnaraflanna.	30

Þakkir

Ég vil þakka leiðbeinendum mínum við verkefnið þeim Sigurði Brynjólfssyni og Bjarna Ásgeirssyni fyrir að hafa gefið mér tækifæri til að vinna að verkefninu þar sem um er að ræða frumkvöðlastarf hér á landi. Hvatning þeirra og stuðningur skiptu mig miklu máli.

Ennfremur stend ég í þakkarskuld við samstarfsfólk mitt á Kerfislíffræðisetri HÍ, sem hefur reynst vel í þessu ferli.

Fjölskyldu minni vil ég þakka fyrir allan stuðning í gegnum tíðina. Hún hefur reynst ómetanleg nú sem áður.

1 Inngangur

Við fyrstu sýn kann Ísland að virðast heldur harðbýlt land sem lítið gefur af sér. Hér er kalt í veðri og sólin hverfur sjónum íbúanna yfir veturinn. Fyrir á öldum hefur eflaust reynst erfitt að koma auga á þá kosti sem landið hefur fram að færa. Þeir eru þó allnokkrir. Við landið eru gjöful fiskimið og mögulega má vinna hér olú í framtíðinni ef áhugi er fyrir hendi. Vindinn má nýta til rafmagnsframleiðslu og stórbrotin náttúra laðar að ferðamenn. Hugvit og mannaúður þjóðarinnar er mikill og hér er nóg af ám og fallvötnum til vatnsvirkjana. Ein helsta auðlind þjóðarinnar er jarðvarmi. Hann nýtist bæði til rafmagnsframleiðslu með jarðvarmavirkjunum og tryggir að nóg sé til af heitu vatni. Hagnýting jarðvarma hefur í för með sér mikla hagsæld fyrir íbúa landsins. Þegar slíkar auðlindir eru nýttar þarf gott mannvit til að sem best nýting á orku eða hráefni náist.

1.1 Jarðhitasvæði og jarðgös

Talsvert magn af jarðgösum losnar út í andrúmsloftið þegar gufa á jarðhitasvæðum er virkjuð. Þessi aukaafurð jarðvarmavirkjana getur verið hvítleið vegna umhverfis- og heilsufarsáhrifa. Koldíoxíð (CO_2) og metan (CH_4) eru gróðurhúsalofttegundir, vetni (H_2) er eldfimt og brennisteinsvetni (H_2S) er eitruð og tærandi. Af þessum sökum er mikilvægt að lágmarka losun þeirra út í andrúmsloftið. Enn vantar fleiri rannsóknir á áhrifum lágs styrks brennisteinsvetnis á heilsu fólks til að meta nákvæmlega hvar réttmæt mörk liggja. Við lágan styrk er þó ljóst að efnið getur valdið ógleði og höfuðverk en við hærri augnskaða og dauða (Orkuveita Reykjavíkur, 2013). Nú er vitað að brennisteinsvetni finnst sem boðefni í líkögum dýra. Fyrir vikið hafa verið gerðar rannsóknir á nýsmíði og niðurbroti brennisteinsvetnis í þeim (Kabil and Banerjee, 2010). Frekari rannsóknir á þessu sviði hjálpa til við að finna og staðfesta áhrif lágs styrks brennisteinsvetnis á mannlíkamann. Til að uppfylla reglugerðir um losun koldíoxíðs (lög 64/2011) og styrk brennisteinsvetnis (reglugerð 514/2010) í andrúmslofti hafa Orkuveita Reykjavíkur, Landsvirkjun og HS orka hrint af stað verkefnum CarbFix og Sulfix. Þau ganga út á að finna sem hagkvæmasta leið við förgun gasa af háhitasvæðum. Losun brennisteinsvetnis frá virkjunum á Hellisheiði og Nesjavöllum var rúmlega 28.000 tonn árið 2012 (Orkuveita Reykjavíkur, 2013). Þetta er því stærsta umhverfisvandamál Orkuveitu Reykjavíkur. Nálægð jarðvarmavirkjananna við byggð hjálpar ekki. Sú leið sem talin er hagkvæmest og hafist var handa við að þróa og nota er aðskilnaður

koldíoxíðs (CO_2) og brennisteinsvetnis (H_2S) frá öðrum jarðgösnum með amínþvottakerfi og niðurdæling þeirra ofan í jarðlög þar sem þau bindast sem steindir. Hafnar eru tilraunir við að blanda brennisteinsvetni við skiljuvatn frá Hellisheiðarvirkjun til að sýra það og minnka kísilútfellingar og lækka þar með viðhaldskostnað. Stofnkostnaður verkefnisins er talinn um 1.250 milljónir króna og rekstrarkostnaður á ársgrundvelli um 100 milljónir króna. Aðrar leiðir hafa komið upp og verið ræddar en ekki þótt nægilega hagkvæmar. Hugmyndir um notkun basa til hlutleysingar brennisteinsvetnis hafa komið upp en þykja ekki fýsilegar og iðnaðarlausnir sem notaðar eru í kola- og olíuiðnaðinum hafa verið ræddar en þykja of dýrar (Orkuveita Reykjavíkur, 2013). Afoxunarspenna brennisteinsvetnis er mjög lág eða um -200 mV við staðalaðstæður og sýrustig $\text{pH} = 7$ (Gong et al., 2013; Virginia Tech, 2003) en lág afoxunarspenna gefur til kynna að efni eigi auðvelt með að gefa frá sér rafeindir. Þetta gerir að verkum að brennisteinsvetni er mun hentugra sem afoxari í efnarafal (þ.e. gjafi á rafeindir) en t.d. vatn (H_2O) sem hefur mun hærri afoxunarspennu. Þannig mætti nýta efnarafal með brennisteinsvetni til rafmagnsframleiðslu. Ókosturinn við þetta ferli er að brennisteinsvetni (H_2S) oxast yfir í brennistein (S^0) sem er torleystur og sest á skautin og hindrar framgang hvarfsins.

1.2 Orkuefnaskipti

Hvað ef hægt væri að nýta brennisteinsvetni með einhverjum hætti? Er einhver möguleiki á að hagnýta þessa baneitruðu lofttegund sem fjármunum er nú eytt í að farga? Hvaða orka eða tækifæri gætu mögulega legið í efnasamsetningu brennisteinsvetnis? Til að fá svör við þessum spurningum þarf að átta sig á þeirri orku sem felst í efnunum og efnatengjum. Dagsdaglega framkvæmir hver maður ýmsa vinnu og þarf til þess orku. Til þess að starfa eðlilega þarf að drekka vatn, borða mat og anda. Lífræn efni í matnum s.s. kolhýdröt, fitur og prótein eru nýtt sem eldsneyti. Mismunandi frumefni og efnasambönd hafa mismunandi sækni í rafeindir. Sum eru sólgin í rafeindir og vilja halda í þær en önnur efni vilja frekar gefa þær frá sér. Þetta nýta lífverur í orkubúskap sinn. Þegar rafeindir flytjast af orkuháu ástandi (svigrúmi) frá efni með litla rafeindasækni í orkulægra ástand (svigrúm) til efnis með meiri rafeindasækni losnar orka sem nýtist lífverunni (orkan er bundin í efnahvörf). Ferli þar sem rafeindir eru fluttar frá efni (tengjum) með litla rafeindasækni til efnis með meiri sækni á sér stað hjá öllum ósjálfbjarga lífverum á jörðinni. Til eru frumbjarga lífverur sem fara aðra leið. Ljóstíllífandi lífverur nýta rafsegulbylgjur frá sólinni sem orkugjafa. Margar lífverur nýta sér síðan það lífræna efni sem verður til fyrir tilstuðlan sólarorkunnar sem orkugjafa (Nelson og Cox, 2008).

Frægasta og áhrifaríkasta dæmi um þetta er notkun súrefnis sem lokarafeindaþega og lífræns efnis sem rafeindagjafa (rafeindauppsprettu). Þetta er sú leið sem dýr nýta sér. Súrefni hefur mikla rafeindasækni og er algengt frumefni og er því einstaklega hentugt sem lokarafeindaþegi. Hæfileiki efna til að afoxast og þar með taka til sín rafeindir frá öðru efni er mældur sem afoxunarspenna. Spenna er skilgreind sem sú vinna sem þarf til að flytja hverja hleðslu á milli tveggja punkta í stöðugu rafsviði og er mæld í voltum. Spenna er miðuð við afoxun vetnis við staðalaðstæður og sýrustig $\text{pH} = 0$, þ.e. spenna hvarfsins $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ er skilgreind sem núll volt. Efni eins og súrefni sem vill taka við rafeindum og afoxast hafa því jákvæða (háa) afoxunarspennu en efni eins og baríum og kalíum sem vilja gefa frá sér rafeindir og þar með oxast hafa neikvæða (lága) afoxunarspennu. Glúkósi hefur afoxunarspennu $-0,43 \text{ V}$ við staðalaðstæður og sýrustig $\text{pH} = 7$. Því meiri munur sem er á afoxunarspennu tveggja efna því meiri orka fæst við flutning rafeinda niður orkustigulinn. Súrefni er sem fyrr segir hentugur lokarafeindaþegi því það finnst í talsverðu magni í umhverfinu og afoxunarspenna þess er há (Nelson og Cox, 2008; Virginia Tech, 2003).

Þekktustu leiðir baktería til öndunar eru notkun súrefnis (O_2), nítrats (NO_3^-), sulfats (SO_4^{2-}) eða koldíoxíðs (CO_2) sem rafeindaþega og lífræns efnis eða vetnis (H_2) sem rafeindagjafa. Á síðustu árum og áratugum hefur fundist fjöldinn allur af bakteríum sem beita öðrum leiðum til öndunar (Lovley og Coates, 2000). Eina forsendan er sú að rafeindagjafinn hafi lægri afoxunarspennu en rafeindaþeginn og þá getur orka losnað. Hver baktería þarf að hafa rafeindaflutningskeðju sem þjónar því hvarfi sem veitir henni orku. Algengasta og líklega best þekkta öndunarleiðin sem ekki var nefnd áður er notkun járn (FeIII) sem rafeindaþega. Rafeindagjafinn getur verið lífrænt efni, vetni eða annað efni með hentuga afoxunarspennu. Hversu vel járnafoxun er varðveitt í lífheiminum og meðal annars í háhitafornbakteríum hefur leitt grun að því að hugsanlega sé járnöndun fyrsta tegund öndunar á jörðinni. Það er athyglisvert að ýmsar járnafoxandi bakteríur geta einnig afoxað aðra málma til orkunýtingar og eins hafa fundist bakteríur sem nota aðallega aðra málma. U(VI), Cr(VI), Mn(VI), Co(III) og Tc(VII) eru allt dæmi um aðra málma sem eru notaðir. Slíkar bakteríur er hægt að nýta til að fjarlægja eittraða málma. Bakteríurnar gætu sem dæmi afoxað skaðlega málma og gert þá torleysta svo hægt sé að fjarlægja þá. Sem dæmi um hagnýtingu baktería til hreinsunar spilliefna má nefna að til eru bakteríur sem nota perklórat (ClO_4^-) sem rafeindaþega. Vopnaframleiðsla, flugeldar og áburðarframleiðsla valda losun perklórats sem er eitruð, auðleysanleg og stöðug sameind. Þess konar bakteríur nýtast við að hreinsa upp

slíka mengun. Eitt er það sem sker sig úr og veldur furðu þegar svo mikið finnst af bakteríum sem nota járn eða aðra málma sem rafeindaþega. Það er að til eru bakteríur sem nota járnnoxíð (Fe_2O_3) sem rafeindaþega en járnnoxíð er torleyst (finnst í ryði) og þannig ólíkt öðrum þekktari rafeindaþegum (Lovley og Coates, 2000). Því þarf að flytja rafeindirnar út úr frumunni. Segja má að torleyst efni utan frumunnar sé hluti af rafeindaflutningskeðju lífverunnar. Áður hefði slíkt verið talið ólíklegt og eru slík ferli enn ekki skilin til fulls. Bakterían *Geobacter sulfurreducens* hefur þó t.d. verið rannsökuð talsvert hvað þessi ferli varðar (Lovley, 2008b)

Talsvert magn finnst af sulfati (SO_4^{2-}) í sjó og setlögum. Ýmsar bakteríur nýta sér sulfat sem rafeindaþega, líklega vegna þess góða framboðs sem er af því. Sulfat hefur fremur lága afoxunarspennu og er að því leyti ekki góður rafeindaþegi. Að öllum líkindum eiga slíkar bakteríur því erfitt með að binda koldíoxíð (CO_2) þar sem lítil orka fæst úr rafeindaflutningskeðju. Þetta geta þær leyst með því að nota lífræn sambönd sem kolefnisgjafa og jafnvel rafeindagjafa líka. Við sulfatöndun verður til brennisteinsvetni (H_2S). Þar sem það er lofttegund losnar það fljótt úr frumunum og eitrunaráhrif minnka þar með. Afoxunarspenna brennisteinsvetnis er mjög lág og efnið því góður rafeindagjafi. Þetta geta bakteríur nýtt sér. Þar sem brennisteinsvetni er lofttegund getur þó verið erfitt að finna það í nægum styrk til að nota sem rafeindagjafa á árangursríkan hátt. Því finnast slíkar bakteríur oft nálægt sulfatbakteríum sem losa brennisteinsvetni við sína öndun eða við jarðhitasvæði. Dæmi um bakteríu sem notar sulfíð (S^{2-}) sem rafeindagjafa er *Thiomargarita namibiensis* en hún oxar sulfíð og afoxar nítrat (NO_3^-) í nitrít (NO_2^-) (Lovley og Coates, 2000).

1.3 Efnaraflar

Í rafhlöðum er efnaorku breytt í raforku með oxunar-afoxunarhvärfum. Rafhlöður samanstanda af tveimur hálfcellum. Anóðu þar sem efni oxast (rafeindir frá efni yfir á rafskaut) og katóðu þar sem efni afoxast (rafeindir frá rafskauti yfir á efni). Utan um anóðuna og katóðuna eru rafvakar ýmist sá sami eða sitt hvor. Flæði jóna milli anóðuklefa og katóðuklefa er tryggt með t.d. saltbrú eða jónaskiptahimnu. Efnaraflar virka á svipaðan hátt nema anóðumegin er notast við eldsneyti og prótónur afoxast katóðumegin. Nokkrar gerðir eru til af lífefnahvöttum röflum. Vegna þess að lífræn efni eiga oft erfitt með að oxast við anóðu efnarafals er ensímum stundum bætt út í lausnina t.d. metanól dehydrogenasa eða glúkósoxíðasa (Sasaki og Karube, 1999). Sá möguleiki að nýta bakteríur sem hvata í efnarafla hefur verið þekktur í næstum 100 ár (Debabov, 2008). Ljóstíllífandi bakteríur sem framleiða

vetni (H_2) hafa sem dæmi verið nýttar í slíkt. Vetnið færir rafeindir yfir á anóðuna og oxast. Þannig kerfi er í raun drifið áfram af sólarljósi. Annað dæmi um mögulega hagnýtingu er að koma ófrumbjarga vetnisframleiðandi bakteríum t.d. *Clostridium butyricum* fyrir anóðumegin og gefa þeim lífrænt efni líkt og glúkósa sem rafeindagjafa. Bakteríurnar framleiða þá vetni sem oxast við anóðuna og straumur myndast (Sasaki og Karube, 1999). Ennfremur hefur verið vitað frá sjöunda áratug síðustu aldar að sumar bakteríur geta nýtt sér utanaðkomandi og oft tilbúin (e. synthetic) efni sem rafeindferjur að rafskauti (Debabov, 2008). Dæmi um slík efni eru neutral red, kalíum ferrícýanið og þíónín (Bond et al., 2002). Þau afoxast inni í frumunni eða við yfirborð hennar og oxast svo við yfirborð anóðunnar. Ókostir við þessa leið er oft ófullkomin oxun lífræns efnis og ófullnægjandi heimtur rafeinda (Debabov, 2008). Fljótlega eftir aldamótin síðustu varð bylting á sviði örveruhvataðra efnarafla þegar fyrir tilviljun fundust bakteríur sem geta fært rafeindir á rafskaut án utanaðkomandi rafeindaferja (Bond et al., 2002; Debabov, 2008; Tender et al., 2002).

Á hafsbotni liggja miklar birgðir lífrænna kolefnissambanda. Á stórum svæðum finnast nokkurra metra þykk setlög sem innihalda 0,1-10% lífræn kolefnissambönd (að þyngd) (Tender et al., 2002). Í slíkum massa lífræns efnis felst gríðarleg orka sem örverur nýta sér. Bakteríur við hafsbotn geta nýtt súrefni (O_2) sem lokarafeindaþega og lífræna massann sem æti. Eftir því sem neðar er farið í setlögum er minna af súrefni og því verða örverurnar að nýta sér verri lokarafeindaþega eins og súlfat (SO_4^{2-}). Afurðir slíkrar öndunar, líkt og súlfíð ($-S^{2-}$), hafa mun lægri afoxunarspennu en vatn sem verður til við súrefnisöndun. Þannig verður til spennunur á milli efstu sentimetranna í setlögum sem getur náð allt að 0,8 V (Tender et al., 2002). Þennan spennun er hægt að nýta til rafmagnsframleiðslu og það er einmitt það sem nokkrir vísindamenn lögðu upp með í Bandaríkjunum árið 2001 (Bond et al., 2002; Tender et al., 2002). Grafítkatóðu var komið fyrir í sjó fyrir ofan setlög sem anóðu var komið fyrir í og þær tengdar saman með rafrás. Engin þörf er á himnu í slíku kerfi því náttúrulegur aðskilnaður súrefnis í sjó og lífræns efnis í setlögum nægir. Framleiðsla rafstraums gekk vel. Þegar farið var að rýna í strauminn sem myndaðist og hvaðan hann kæmi varð ljóst að hið hefðbundna „abiotic“ oxunarhvarf súlfíðs ($-S^{2-}$) yfir í brennistein (S^0) gat ekki skýrt nema hluta af þeim straumi sem myndaðist. Tekin voru sýni af grafítanóðunni bæði í virkum efnarafli og í viðmiði til að greina örveruflórana. Delta-próteóbakteríur voru áberandi á yfirborði virku anóðunnar. Meirihluti þessara delta-próteóbaktería tilheyrði fjölskyldu Geobacteraceae sem afoxa torleyst járnóxíð ($Fe(III)$) og brennistein (S^0). Mestur

skyldleiki þekktrar hreinnar ræktar var við *Desulphuromonas acetoxidans* sem oxar asetat ($C_2H_3O_2^-$) og afoxar sulfíð og járnnoxíð en asetat finnst í miklum mæli í setlögnum. Tilraun var sett upp á rannsóknarstofu þar sem setlagagruggi var komið fyrir anóðumegin en því síðan í skrefum skipt út fyrir loftfirrtan sjó með viðbættu asetati (Bond et al., 2002). Eftir 85 daga tilheyrði um 70% af 16S rDNA úr anóðuklefanum ættkvísl *Desulphuromonas*. Vísindamennina var farið að gruna að sá auka straumur sem fékkst gæti stafað af beinum flutningi rafeinda frá bakteríu að rafskauti. Rétt eins og þær notuðu torleyst járnnoxíð sem rafeindaþega gætu þær notað rafskaut. Til að sannreyna þessa kenningu var sett upp kerfi þar sem *D. acetoxidans* var komið fyrir anóðumegin loftfirrt og katóðumegin var dauðhreinsaður buffer. Elektróðurnar voru tengdar með 500-ohm viðnámi. Þegar asetati var bætt við anóðumegin komst strax straumur á kerfið. Viðbót rafeindaferjunnar anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) jók strauminn aðeins 24% og hitun til að drepa bakteríurnar kom í veg fyrir framleiðslu straums. Bakterían ræktaðist upp við þessar aðstæður og virtist vöxtur sambærilegur við vöxt hennar þegar notaðir voru aðrir þekktir rafeindaþegar. Án tengingar við sellu (efnarafal) varð enginn vöxtur þó *D. acetoxidans* væri komið fyrir á rafskauti og asetat til staðar (Bond et al., 2002). Kenningin virtist því vera rétt. Bakterían virtist geta notað rafskaut sem beinan rafeindaþega. Sami hópur vísindamanna kannaði nú hvort að náskyld baktería, *Geobacter sulfurreducens* sem lifir í ferskvatni gæti einnig notað rafskaut sem lokarafeindaþega og reyndist svo vera. Að lokum var svo enn ein skyld baktería athuguð. Þekkt var að *Geobacter metallireducens* getur oxað arómatísk efni og afoxað Fe(III). Tilraun sýndi að hún gat notað bensóat sem æti og rafskaut sem lokarafeindaþega. Hér höfðu því fundist þrjár skyldar bakteríur úr fjölskyldu Geobacteraceae sem allar gátu oxað lífrænt efni og notað rafskaut sem lokarafeindaþega. Þær eiga það sameiginlegt að geta afoxað torleyst Fe(III) (Bond et al., 2002; Embree et al., 2014; Sydow et al., 2014). Því hafði í leiðinni fundist áhugaverð tenging. Svo virðist sem sumar bakteríur sem notað geta torleyst málmsambönd sem lokarafeindaþega hafi sameindalíffræðilegar leiðir til að nýta einnig rafskaut sem lokarafeindaþega. Það liggur í augum uppi að slíkar bakteríur kynnu að verða gagnlegar við eyðingu lífræns úrgangs þar sem rafmagn er framleitt í leiðinni.

1.4 Flutningur rafeinda að rafskauti

Vísbendingar um að til væru bakteríur sem færar væru um efnaskiptaferla þar sem rafeindir eru fluttar að rafskauti hafa legið fyrir í þó nokkurn tíma (Lovley, 2008a; Rabaey og Rozendal, 2010). Uppgötvun baktería rétt eftir síðustu aldamót sem geta að fullu oxað lífræn

efni og afoxað rafskaut með áhrifaríkum hætti var bylting á sviði örveruhvataðra efnarafa. Á síðustu árum hefur fjöldi rannsókna á þessu sviði vaxið gríðarlega sem og fjöldi þekkra baktería sem geta framkvæmt slík hvörf (Lovley, 2008a; Rabaey og Rozendal, 2010; Sydow et al., 2014). Kostir notkunar baktería í efnarafal eru þeir, að þær geta nýtt orku sem finnst í ótal úrgangs- eða spilliefnum sem annars væri erfitt að nýta og jafnvel mjög kostnaðarsamt að losna við. Á móti kemur að rafmagnsframleiðsla slíkra kerfa hefur ekki verið nægjanlega mikil hingað til og því þarf leiðir til að bæta hana, bæði líffræðilegar og verkfræðilegar (Logan et al., 2006; Lovley, 2006, 2008a). Ljóst er að bakteríur sem í náttúrunni geta afoxað torleyst málmambönd og þá aðallega Fe(III) (Lovley, 2008a) eru þær bakteríur sem líklegast eru til að hafa tæki og tól til að nota rafskaut í sinn orkubúskap. Áhrifaríkasta leiðin við að finna nýjar tegundir rafskautsandi baktería er að kanna hvort tiltekin tegund þrífist á tengdu rafskauti. Enn vantar nokkuð upp á að örveruknúnir efnarafar séu nægilega afkastamiklir til að knýja stór tæki en þeir gagnast þó við að búa til straum úr efnem sem annars væru óaðgengileg sem orkugjafi og eru oft mengandi. Til að auka afköst slíkra kerfa er tvennt í stöðunni. Annars vegar að beita þekkingu á sviði verkfræði til að hanna sem áhrifaríkast kerfi t.d. með bestun á rafskautum og byggingu efnarafals í huga og hins vegar að vinna með bakteríurnar. Bæði er hægt að reyna að ná fram aðlögun með endurtekinni ræktun á rafskautum. Þar sem fáar ef nokkrar bakteríur hafa þróast við þær aðstæður að anda með rafskautum verður að teljast líklegt að slík aðlögun beri einhvern árangur í að bæta afköst kerfis. Einnig er hægt að nýta þekkingu á sviði erfðafræði til að hafa áhrif á genamengi bakteríanna og stýra þeim í átt að meiri rafmagnsframleiðslu t.d. með því að auka tjáningu á genum sem hafa með ferli rafskautsöndunar að gera. Til að þetta sé hægt þarf þó að liggja fyrir kortlagning á genamengi þeirra og skilningur á þeim ferlum sem standa að baki flutningi rafeinda frá frumunni yfir á rafskaut. Þar sem um nýtt svið er að ræða liggur ekki fyrir eins mikil þekking á þessum ferlum og vonast var eftir. Engu að síður hafa þó nokkrar rannsóknir verið birtar á liðnum árum sem varpa nokkru ljósi á þessa ferla. Þær bakteríur sem mest hafa verið rannsakaðar með tilliti til færslu rafeinda að rafskauti eru *G. sulfurreducens* og *Shewanella oneidensis*. Þar að auki hefur *S. oneidensis* verið rannsökuð talsvert mikið hvað varðar járnöndun (Lovley, 2008a, 2008b) og stjórnun gena sem hafa með járnúskap *G. sulfurreducens* að gera hefur verið skoðuð í þaula (Lovley, 2008a, 2008b; Rabaey og Rozendal, 2010). Slíkar rannsóknir hjálpa til við að átta sig betur á flóknum orkubúskap þess konar baktería. Rannsóknir sem skoða hvernig rafeindirnar flytjast á rafskaut eru veigamestar í þessu samhengi. Yfirlitsgreinar um efnið hafa verið birtar á síðustu árum (Lovley, 2008a,

2008b; Rabaey og Rozendal, 2010; Sydow et al., 2014). Fjölbreytileiki lífheimsins er ótrúlegur og við fyrstu sýn virkar sá heimur sem fræðigreinar lúsa fjarlægur hefðbundnum og þekktum ferlum innan lífefnafræði. Þegar betur er að gáð sést þó að unnið er með svipaða þætti og finnast annars staðar í fræðunum. Sé það rétt að járnöndun sé jafnvel fyrsta tegund öndunar á jörðinni kunna ferlar sem líkjast þessum að vera mun eldri en þær leiðir sem menn hafa þekkt til öndunar og rafeindaflutnings fram að þessu. Þó að að nokkur fjöldi ólíkra örvera með hæfileika til að anda með rafskauti hafi fundist, t.d. ýmsar próteóbakteríur, bakteríur af ættkvísl *Clostridium*, fornbakteríur, gersveppir og smápörungar (Sydow et al., 2014), hafa rannsóknir á eðli utanfrumurafeindaflutnings aðallega farið fram á *G. sulfurreducens* og *S. oneidensis* (áhersla er lögð á GRAM neikvæðar bakteríur því þær hafa sýnt meiri færni við utanfrumurafeindaflutning) (Rabaey and Rozendal, 2010). Ástæðan fyrir þessu er líklega sú að genamengi þeirra beggja var raðgreint fyrir rúmum tíu árum og þær þykja efnilegar til notkunar í rafmagnsframleiðslu á stærri skala í framtíðinni (Sydow et al., 2014). Því má líta á þær sem hálfgerðar módel-lífverur fyrir rannsóknir á þessu sviði.

Flutningur rafeinda frá bakteríu getur bæði verið beinn eða óbeinn. Beinn flutningur byggir aðallega á notkun cytochróma af gerð c (cytochróm c eru vatnsleysanleg, ólíkt öðrum cytochrómum). Cytochróm eru prótein sem innihalda heme-hópa og taka þátt í rafeindaflutningskeðju lífvera. Cytochróm sem innihalda mismarga heme-hópa hafa sína sérstöku afoxunarspennu. Slík raðtengd cytochróm mynda keðju með mismunandi spennu sem þó skarast að einhverju leyti. Þannig geta rafeindir færst frá innri himnu í gegnum periplasmann að ytri himnu og loks út úr frumunni og að rafskauti. Annað dæmi um beinan flutning rafeinda sem bæði *G. sulfurreducens* og *S. oneidensis* eru færar um er myndun festiþráða (pili) sem kallaðir hafa verið nanóvírar því þeir leiða rafmagn og geta þannig séð fyrir flæði rafeinda að rafskauti. Engin lausn hefur enn fengist á því hvernig slíkir nanóvírar virka nákvæmlega en ein af tilgátunum er að í nanóvírum *G. sulfurreducens* geti rafeindirnar flust vegna þökkunar π -rafeinda arómatrískra amínósýra í festiþræðinum og hann leiði þannig rafmagn líkt og um málms væri að ræða (Malvankar og Lovley, 2014; Sydow et al., 2014). Báðar þessar leiðir krefjast þess að bakteríurnar myndi örveruþekju um rafskautið. Ýmist getur verið um einnar frumu lag að ræða og/eða þykka örveruþekju. Cytochróm á ytra borði bakteríanna sem liggja næst rafskautinu eru í beinni snertingu við það og flytja rafeindir. Fyrirnefndar bakteríur geta báðar myndað nokkuð þykkar (nokkur hundruð míkrómetra) (Sydow et al., 2014) örveruþekjur og tilraunir sýna að *G. sulfurreducens* getur myndað meira

en 50 míkrometra þekju við anóðu. Þekjan er rafleiðin og því þykkari sem hún er því meiri straum myndar hún. Nanóvírar eru taldir mikilvægir svo að ytri frumur þekjunnar geti komið rafeindum á rafskautið en þær seyta einnig cytochrómum í þekjuna sem eru þó fest við utanfrumu pólýsakkarið sem bakterían framleiðir. Þannig fæst þykkt lag af frumum sem allar geta fært rafeindir beint yfir á rafskaut og myndað straum. *G. sulfurreducens* virðist eingöngu fær um að koma rafeindum yfir á rafskaut með myndun örveruþekju sem myndar beina tengingu við rafskaut. *S. oneidensis* getur á hinn bóginn bæði myndað örveruþekju og lifað í lausninni sem umlykur rafskautið og fært rafeindir um langan veg að rafskautinu. Þetta er dæmi um óbeinan rafeindaflutning (Lovley, 2008a; Sydow et al., 2014). Þó að *S. oneidensis* geti myndað festiþræði virðast þeir ekki leggja til mikinn straum. Þeir virðast því ekki vera nanóvírar af sama meiði og *G. sulfurreducens* hefur. Rannsóknir hafa sýnt að rafleiðni þeirra byggist líklega á „rafeindastökki“ (e. electron hopping) á milli þéttra keðja cytochróma í þráðunum (Malvankar og Lovley, 2014). Óbeinn rafeindaflutningur er því meginleið *S. oneidensis* til að færa rafeindir að rafskauti. Flutningurinn verður aðallega með rafeindaferjum. *S. oneidensis* nýtir sér flavín sem rafeindaferju en einnig er hægt að nota önnur efni. *Pseudomonas aeruginosa* notar t.d. fenazín. Lítil arómatísk efni virðast í raun algeng í rafeindaflutningi að anóðu (Sydow et al., 2014). Taka skal fram að hér er um efni að ræða sem bakteríurnar sjálfar framleiða en ekki tilbúnar utanaðkomandi rafeindaferjur sem notaðar hafa verið um langt skeið í örveruhvataða efnarafla. Sumar bakteríur geta eins og áður hefur komið fram myndað vetni (H_2) eða t.d. maurasýru (CH_2O_2) eða rafvirk niðurbrotsefni lífefna (e. metabolites) sem geta hjálpað til við flutning rafeinda. Með þessum leiðum getur bakterían flutt rafeindir um langan veg að rafskauti. Þó að meginleið *S. oneidensis* til rafskautsöndunar sé í gegnum flavín eru cytochróm af gerð c einnig mikilvæg fyrir hana þegar kemur að framleiðslu rafstraums í efnarafli. Kann að vera að cytochróm geti nýst við rafeindaflutning að skauti hjá þeim frumum sem liggja næst skautinu og/eða að þau séu nauðsynleg til að afoxa flavín sem síðan flytja rafeindirnar áfram (Lovley, 2008a; Sydow et al., 2014). Sýnt hefur verið fram á að *S. oneidensis* getur fundið rafeindaþega með aðstoð chemotaxisgena. Þannig geta bakteríurnar leitað uppi torleysta rafeindaþega (Sydow et al., 2014). Þó svo að rannsóknir á leiðum til rafskautsöndunar séu nær eingöngu framkvæmdar á hreinni rækt er raunin sú að blönduð rækt baktería gefur oftast mun betri raun. Samlífi tveggja eða fleiri baktería á eða við rafskaut er því oft betri kostur (Lovley, 2008a; Nagarajan et al., 2013; Sydow et al., 2014). Engu að síður hafa sumar hreinar ræktir sýnt að þær geta keppt við blandaðar ræktir. Kostur við blandaðar ræktir er að þar geta mismunandi bakteríur hjálpast að

við að oxa efni. Þannig getur rafeindagjafi einnar bakteríu verið óaðgengilegur annarri en niðurbrotsefni þeirrar fyrrnefndu verið rafeindagjafi fyrir þá næstu sem getur þá t.d. skilað rafeindunum yfir á rafskaut. Eins geta sumar bakteríur fært rafeindir sín á milli með nanóvírum. Ein bakterían getur þar með séð hinni fyrir nauðsynlegum næringarefnum á meðan hin útvegar orku (í formi rafmagns). Einnig geta bakteríurnar framleitt rafeindaferjur fyrir aðrar bakteríur. Þannig geta niðurbrotsefni einnar bakteríu virkað sem rafeindaferjur að rafskauti fyrir hina o.s.v.frv. Nýleg grein um áhrif beins rafeindaflutnings á samlífi baktería skoðar *G. sulfurreducens* og *G. metallireducens* (Nagarajan et al., 2013). Slíkar rannsóknir geta skapað þekkingu sem síðar getur nýst við rannsóknir á örverufræðilegum efnaröflum.

1.5 Örveruhvataður rafsamruni

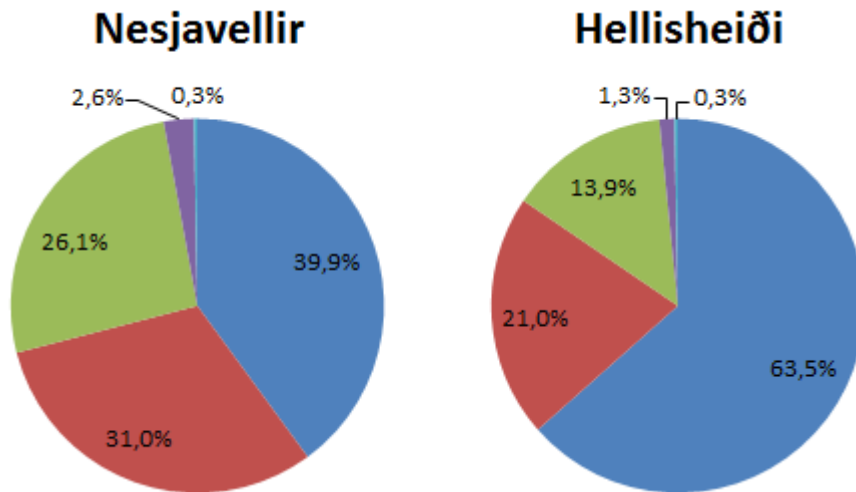
Hingað til hefur verið fjallað um anóðu efnarafals og bakteríur sem tengjast henni. Langmest áhersla rannsókna hefur verið á anóðuhluta örveruhvataðra efnarafla. Aðeins nokkur ár eru síðan bakteríur fundust sem geta tekið beint við rafeindum af rafskauti og nýtt til framleiðslu lífræns efnis. Fram að því var hægt að nýta bakteríur til svipaðrar framleiðslu með tvennum hætti, annars vegar með framleiðslu vetnisgass (H_2) við katóðuna og hins vegar með notkun tilbúinna rafeindaferja. Ferlið þar sem hvörf eru hvötuð af bakteríum katóðumegin í efnarafli með hjálp rafmagns er kallað örveruhvataður rafsamruni (e. microbial electrosynthesis). Hvörf við katóðuna hafa ýmist áhrif á gerjunarferla eða öndunarferla. Ýmsar bakteríur nýta vetnisgas (H_2) sem rafeindagjafa og binda koldíoxíð (CO_2) og þannig má nýta efnarafal til bindingar koldíoxíðs og framleiðslu lífræns efnis. Þó þetta sé áhugaverð leið felast í henni hið minnsta tveir ókostir. Vetnið leysist ekki upp í nægilega háum styrk nema þrýstingur sé settur á kerfið og yfirspennu þarf á kerfið til að vetni myndist í miklum mæli. Önnur leið er notkun rafeindaferja eins og neutral red, methyl viologen og þíonín (Rabaey and Rozendal, 2010). Methyl viologen getur sem dæmi oxað $NAD(P)^+$ í $NAD(P)H$ með aðstoð $NAD(P)^+$ ferredoxin oxidoreduktasa. Kostur við tilbúna rafeindaferjur er að hægt er að ráða meira um hvaða spennu unnið er með og styrkur þeirra getur verið mjög hár í lausninni, auk þess að þær eru endurnýtanlegar. Ókostir eru þeir að rafeindaferjurnar eru oft óstöðugar og mögulega eitradar.

Nýlega hafa birst niðurstöður rannsókna sem benda til beins rafeindaflutnings frá rafskauti til bakteríu. Sú leið þykir fýsilegri en þær leiðir sem áður þekktust. Ferlar sem liggja að baki eru enn óþekktir. Rannsóknir benda til þess að þeir byggi ekki endilega á sömu leiðum og færsla rafeinda frá frumum og að rafskauti (þ.e.a.s. ferlinu er ekki bara snúið við)

(Lovley, 2008a; Rabaey og Rozendal, 2010; Sydow et al., 2014). Sem dæmi hafa fundist tegundir sem ekki innihalda cytochróm en geta engu að síður tekið við rafeindum af skauti. *G. sulfurreducens* sem mikið hefur verið rannsökuð með tilliti til rafskautsöndunar er einnig fær um að taka við rafeindum frá rafskauti en vitað er að ferlarnir eru ólíkir þó sá síðari sé lítið þekktur. Örveruþekjur *G. sulfurreducens* eru sem dæmi mun þynnri þegar þær taka við rafeindum af skauti en þegar þær færa þær yfir á skaut. Dæmi um aðrar tegundir sem geta tekið beint við rafeindum af rafskauti eru *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sporomusa ovata* og *Clostridium* sp. (Sydow et al., 2014). *S. ovata* getur notað vetni sem rafeindagjafa og bundið koldíoxíð en rannsókn sýndi að bakterían gat tekið við rafeindum beint af rafskauti og afoxað koldíoxíð í asetat eða 2-oxobutyrat (Nevin et al., 2010). Af þessu sést að möguleiki er á eldsneytisframleiðslu með aðstoð baktería og efnarafals. Nýting örveruhvataðs rafsamruna til eldsneytisframleiðslu á iðnaðarskala er enn á upphafsstigi. Sigrast þarf á ýmsum hindrunum á sviði líffræði, verkfræði og efnafræði til að hámarka þá möguleika sem tæknin býður upp á (Rabaey et al., 2011). Með aðstoð genatækni verður kannski hægt að ná fram meiri og hagkvæmari framleiðslu á lífoldsneyti. Í framtíðinni verður jafnvel hægt að örva bakteríur til framleiðslu á enn verðmætari efnum s.s. plastefnum eða efnum sem nýtast í iðnaði eða lyfjageira. Uppgötvanir síðustu ára á þessu sviði hafa vakið upp áhuga sem vonandi með tíð og tíma skilar samfélaginu þeim ágóða sem tæknin gefur fyrirheit um.

1.6 Hagnýting baktería í efnarafli

Gríðarlegt magn jarðhitagasa losnar út í andrúmsloftið á Íslandi ár hvert. Útstreymi Hellisheiðarvirkjunar og Nesjavallavirkjunar á brennisteinsvetni árið 2012 var yfir 28.000 tonn (Orkuveita Reykjavíkur, 2013). Hlutfall gasa frá Nesjavallavirkjun (sjá mynd 1) er: 39,9% koldíoxíð (CO₂); 31,0% brennisteinsvetni (H₂S); 26,1% vetni (H₂); 2,6 % köfnunarefni (N₂) og 0,3% metan (CH₄).



Mynd 1. Hlutfall gasa frá jarðvarmavirkjunum á Hellisheiði og Nesjavöllum.

Til vinstri má sjá hlutfall frá Nesjavallavirkjun og til hægri hlutfall frá Hellisheiðarvirkjun. CO₂ (blár), H₂S (rauður), H₂ (grænn), N₂ (fjólublár), CH₄ (ljósblár)

Hlutfall gasa frá Hellisheiðarvirkjun (sjá mynd 1) er aðeins frábrugðið gasi frá Nesjavallavirkjun. Það er: 63,5 % koldíoxíð (CO₂); 21,0 % brennisteinsvetni (H₂S); 13,9 % vetni (H₂); 1,3 % köfnunarefni (N₂) og 0,3% metan (CH₄). Hellisheiðarvirkjun losar því hlutfallslega meira af koldíoxíði en Nesjavallavirkjun en hlutfallslega minna af brennisteinsvetni, vetni og köfnunarefni (Edda S. P. Aradóttir, 2015).

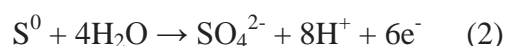
Við Hellisheiðarvirkjun er bæði koldíoxíði og brennisteinsvetni dælt ofan í jarðlögin fyrir neðan þar sem gösin bindast jarðlögum og mynda steindir. Koldíoxíð er gróðurhúsalofttegund og því mikilvægt að hafa stjórn á losun þess í andrúmsloftið. Brennisteinsvetni er eitruð lofttegund og því réttast að lágmarka losun þess í umhverfið. Sú leið að dæla gösunum niður er talin langhagkvæmust eins og staðan er um þessar mundir (Orkuveita Reykjavíkur, 2013). Vegna neikvæðrar afoxunarspennu brennisteinsvetnis eða minna en -200mV við sýrustig pH = 7 (Virginia Tech, 2003) er það efni fýsilegur kostur til notkunar anóðumegin í efnarafal. Þannig mætti oxu brennisteinsvetni og afoxa rafskaut. Með þessum hætti er hægt að nýta þessa eitruðu gastegund í rafmagnsframleiðslu. Við staðalaðstæður (pH = 0) þarf hið minnsta -273 mV spennu til að knýja fram hvarfið og enn meiri spennu til að fulloxa brennisteininn og nýta þar með allar mögulegar rafeindir. Ókostur við aðferðina er að brennisteinn (S⁰) sest sem þéttfni á skautin og hindrar framgang hvarfsins (Rabaey et al., 2006). Því þyrfti annað hvort að hreinsa anóðuna mjög reglulega eða hanna rafskaut sem gætu hrint brennisteininum frá sér. Líkur eru á að slík skaut yrðu kostnaðarsöm

í framleiðslu en engu að síður verðug leið að skoða. Annar möguleiki er notkun örveruhvataðra efnarafla. Með aðstoð baktería mætti ef til vill halda áfram með hvarfið og oxabrennisteininn alla leið yfir í sulfat. Þannig losna skautin ekki aðeins við torleystan brennistein heldur fást einnig fleiri rafeindir til straumframleiðslu.

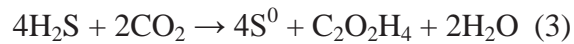
Desulfobulbus propionicus heitir baktería sem fundist hefur í loftfirtri leðju á landi og setlögum á hafsbotni (Pagani et al., 2011; Tender et al., 2002). Bakterían er sporöskjulaga (1-1,3 x 1,8-2µm) og Gram neikvæð. Hún myndar festiþræði en getur ekki myndað gró. Genamengi *D. propionicus* var raðgreint fyrir nokkrum árum (Pagani et al., 2011). Frumurnar eru ýmist stakar, tvær saman eða í keðjum og vaxa við hitastigsbilið 10-43 °C og sýrustig pH = 6,0-8,6. Kjörhitastig þeirra er 39°C og kjörsýrustig pH = 7,1-7,5. Bakterían hefur fjölbreyttar leiðir til orkubúskapar. Helsta leið hennar til lífsviðurværis er að oxaprópíónat eða aðrar lífrænar sýrur eins og laktat, bútýrat og etanól yfir í asetat og afoxa sulfat í leiðinni. Hún notar því lífræn efni sem kolefnisgjafa og á erfitt með að binda koldíoxíð. Bakterían er því í grunninn „chemoorganoheterotroph“ þó varast skuli að flokka hana í einn hóp. Hún var í fyrstu talin algjörlega loftfirrt en seinni rannsóknir leiddu í ljós að hún getur oxað sulfíð og afoxað súrefni til vaxtar (Garrity, 2001). Fyrir um tuttugu árum var greint frá rannsókn sem sýndi að *D. propionicus* getur oxað brennistein og afoxað járn(III)oxíð til orkunýtingar (Lovley og Phillips, 1994). Áhugavert er að ferli járn(III)öndunar virðist óháð sulfatöndun (Holmes et al., 2004). Leiðir bakteríunnar til orkunýtingar eru mun fleiri en ekki er ástæða til þess að fjalla nánar um þær hér. Dæmi um aðra rafeindagjafa bakteríunnar við hinar ýmsu aðstæður eru vetni (H₂) og brennisteinn (S⁰) (og brennisteinssambönd) og dæmi um aðra mögulega rafeindaþega eru nítrít (NO₂⁻), nítrat (NO₃⁻) og mangan (Mn(IV)) (Gong et al., 2013; Holmes et al., 2004). Notkun járn(III)oxíðs sem lokarafeindaþega gaf vísbendingar um að ef til vill gæti bakterían þá einnig andað með rafskauti fyrst hún gat notað torleyst járnnoxíð. Bakteríur af ættkvísl *Desulfobulbaceae* hafa fundist í talsverðum mæli á anóðum efnarafla á hafsbotni. Í ljós kom að bakterían gat „andað“ með rafskauti og notað til þess bæði lífrænar sýrur eins og própíónat og laktat en einnig brennistein. Bakterían fulloxaði brennisteininn yfir í sulfat. Færsla rafeinda yfir á rafskaut virðist tilkomin vegna örveruþekju því þegar nýju æti var skipt út fyrir eldra í efnarafli jókst straummyndun um leið. Bakteríurnar sátu því greinilega að einhverju leyti fastar á skautinu og færðu rafeindir á rafskautið. Þekkt rafeindaferja anthraquinón-2,6-disulfónat (AQDS) (Lovley, 2008a) gat einnig nýst sem rafeindaþegi. *D. propionicus* er fyrsti þekkti sulfatafoxarinn sem getur afoxað torleyst

járnnoxíð og jafnframt fyrsti súlfatafoxarinn sem getur andað með rafskauti (Holmes et al., 2004). Síðan hefur fundist önnur tegund af ættkvísl *Desulfuromonas* (strain TZ1) sem getur framkvæmt sama hvarf á skilvirkari hátt (Zhang et al., 2014) þ.e.a.s. töluvert hærra hlutfall súlfats myndast. Þessar bakteríur geta báðar notað Fe(III) og súlfat sem lokarafeindagega. Þegar leitað er að nýjum bakteríum sem gætu framkvæmt sama hvarf er því eðlilegt að líta til baktería sem framkvæmt geta fyrrnefnd hvörf. Uppgötvunin að *Desulfuromonas* sp. geti notað brennistein sem rafeindagjafa fyrir afoxun rafskauts veldur því að menn spyrja sig hvort asetat og önnur lífræn efni spili ekki eins stórt hlutverk í straumframleiðslu örveruhvataðra efnarafla á hafsbotni og haldið var fram. Mögulega gegnir brennisteinn þar veigameira hlutverki en áður var talið. Þetta liggur þó ekki ljóst fyrir og frekari rannsókna er þörf. Nú hafa því tvær tegundir baktería fundist sem geta fulloxað brennistein og fært rafeindirnar yfir á rafskaut. Tilraunir í efnarafli hafa verið framkvæmdar á báðum þessum bakteríum (Gong et al., 2013; Zhang et al., 2014).

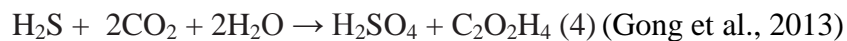
Gong o.fl. birtu grein árið 2013 sem er sérstaklega áhugaverð m.t.t. nýtingar jarðgasa frá jarðvarmavirkjunum á Íslandi. Anóðumegin í efnarafli var komið fyrir *D. propionicus* og katóðumegin *S. ovata*. Anóðumegin var svo súlfíði bætt inn á kerfið. Þar oxaðist það yfir í brennistein án aðstoðar bakteríanna og færði tvær rafeindir yfir á rafskaut. *D. propionicus* tók þá við og fulloxaði brennistein yfir í súlfat. Í leiðinni færðust sex rafeindir yfir á rafskautið. Katóðumegin tók *S. ovata* við rafeindunum, en hún er fær um taka við rafeindum af rafskauti og afoxa koldíoxíð yfir í asetat. Í gasi jarðvarmavirkjana er bæði mikið koldíoxíð og brennisteinsvetni. Með aðstoð efnarafals og þessara baktería (eða svipaðra) er hægt að nýta þá orku sem felst í brennisteinsvetni til að binda koldíoxíð sem eldsneyti (asetat). Þannig er vandamálið varðandi förgun gasanna ekki aðeins leyst heldur hafa þau verið hagnýtt til orkuframleiðslu. Koldíoxíð sem er skaðleg gróðurhúsalofttegund hefur bundist sem eldsneyti og eitruð brennisteinsvetni hefur oxast yfir í súlfat sem er bæði auðleyst í vatni og tiltölulega skaðlaust. Súlfatið sem verður til mætti sem dæmi einfaldlega dæla út í sjó. Anóðumegin í efnaraflinum fara fram tvö hvörf. Hið fyrra án hjálpar bakteríunnar en hið seinna með henni. Þau eru:



Katóðumegin á sér hins vegar stað binding koldíoxíðs samkvæmt jöfnunni:



Heildarhvarf örveruhvataða efnarafalsins er því:



Kerfislíffræðisetur HÍ hefur um nokkurt skeið unnið í samstarfi við vísindamenn við Tækniháskólann í Danmörku, DTU (The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability) að hagnýtingu slíks kerfis. Í Danmörku er verið að vinna með katóðu efnarafalsins. Bæði er verið að skoða aðrar hugsanlegar bakteríur til notkunar á katóðunni og hvernig megi erfðabreyta þær til að framleiða verðmæt efni með miklum afköstum. Hlutverk Kerfislíffræðisets HÍ er að besta efnahvarfið sem á sér stað anóðumegin. Hugmyndin er að í framtíðinn verði brennisteinsvetni af háhitasvæðum á Íslandi notað anóðumegin og koldíoxíð frá sömu svæðum notað katóðumegin.

Hlutverk þessa verkefnis var að kanna hvort notkun skiljuvatns (niðurdælingarvatns) sem inniheldur bæði brennisteinsvetni og koldíoxíð ásamt fjölda annarra efna í snefilmagni geti nýst sem rafeindagjafi bakteríunnar. Tilgátan er sú að þetta sé mögulegt og að lítill munur sé á því að nota skiljuvatn og þá dauðhreinsuðu loftfirrtu blöndu súlfíðs sem notuð hefur verið fram að þessu.

2 Framkvæmd rannsóknar og aðferðir

Natríum sulfíð (Na_2S) er rammur basi en brennisteinsvetni (H_2S) er veik sýra. Þar sem sýrustig efnarafalsins var stillt eftir sulfíðviðbót á sýrustig í kringum $\text{pH} = 7$ á þessi munur ekki að hafa áhrif. Bakterían ætti að geta framkvæmt hvarfið sama hver uppruni brennisteinsins er. Í skiljuvatninu gætu þó leynst efni sem áhrif hafa á hvarfið og því þarf að kanna hvort það sé ekki örugglega nothæft til bakteríuræktunar. Styrkur brennisteinsvetnis í skiljuvatni er talsvert meiri en mesti styrkur sem unnið hefur verið með í örveruhvötuðum efnarafli. Sá styrkur sem unnið hefur verið með er þó hærri en sá styrkur sem flestar sulfatafoxandi bakteríur eru sagðar þola (Cypionka, 1995). Að þessu sinni verður skiljuvatnið því þynnt út. Síðar er nauðsynlegt að rannsaka hvort bakterían þoli enn hærri styrk sulfíðs. Til að bera saman afköst kerfisins annars vegar með skiljuvatni og hins vegar með Na_2S -lausn verður styrkur sulfíðs og sulfats mældur anóðumegin í efnaraflinum. Unnið var með bakteríuna *D. propionicus* anóðumegin en engin baktería var katóðumegin að þessu sinni.

2.1 Bakteríuræktun

Bakterían *D. propionicus* var fengin frá rannsóknarhópi í kerfislíffræði við Kaliforníuháskóla í San Diego. Uppskrift að æti var fengin frá sömu aðilum. Í 1,8 L af milliQ vatni voru sett: 2,11 g af NaCl ; 0,89 g af $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,54 g af KCl ; 0,27 g af $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,48 g af NH_4Cl ; 0,37 g af KH_2PO_4 ; og 5,11 g af Na_2SO_4 . Gasblöndu sem innihélt 5% koldíoxíð og 95% köfnunarefni var blásið í gegnum lausnina í um 2 klst. til að losa hana við súrefni. Lausnin var sett í autoklava (þrýstiketil). Gúmmítappa var komið fyrir í bikarglasi og álpappír settur yfir. Hann var autoklavaður með lausninni. Gúmmítappinn var síðar settur á flöskuna við dauðhreinsaðar aðstæður í frumuræktunarskápi. Útbúnar höfðu verið ýmsar lausnir á þessu stigi. Allar lausnir voru blandaðar (þynntar) í súrefnissnautt milliQ-vatn. Lausnirnar voru ýmist dauðhreinsaðar í autoklava eða með filtrun (örsíun) eftir því hvað þær þola. Í frysti voru til þíamín (1,35 g/L) og B12 (5,0 g/L) lausnir og voru þær notaðar. Sextíu og sjö μL af B12 stofnlausn var bætt í ætislusn til að gefa lokastyrk 0,05 mg/L og 36 μL af þíamín stofnlausn var bætt út í til að gefa lokastyrk 0,1 mg/L. Bæði þessi vítamín voru þó líka í vítamínblöndu sem einnig var notuð. Öllum efnum sem héðan af var bætt út í lausnina var sprautað í gegnum gúmmítappa. Útbúnar voru lausnir af ríbóflavíni (25 mg/L) og selenít-

tungsten (3,9 mg/L af Na_2SeO_3 og 8 mg/L af Na_2WO_4). Af hverri lausn var 1,8 mL bætt út í ætið. Því næst var 1,8 mL af 1000x „trace mineral“ blöndu og 3,6 mL af 500x vítamínblöndu bætt við. Að lokum var bætt út í ætið 45 mL af 1 M NaHCO_3 og 3,6 mL af 1 M Na_2S . Sýrustig var stillt í kringum $\text{pH} = 7,3$ með 1 M H_2SO_4 (brennisteinssýru) og/eða 1 M NaOH (vítissóða). Köfnunarefni var dælt í flöskuna til að mynda yfirþrýsting. Við ræktun voru notaðar 125 mL serum flöskur með læstum gúmmítappa. Í dauðhreinsuðum serumflöskum var komið fyrir 90-95 mL af æti. Um 1 mL af 1 M natríum própíonatlausn var bætt út í hverja serumflösku áður en 5-10 mL af eldri bakteríurækt var bætt við. Fyrstu rækt var sáð út frá 1 mL af frumum sem höfðu verið -80°C frysti frá sumrinu áður. Bakterían var ræktuð í hitaskáp við um það bil 37°C (hitaskápur sveiflaðist talsvert í hita og því var ekki ráðlegt að stilla hita nær 39°C). Rækt var tekin til geymslu með því að færa bakteríur í vaxtarfasa í Eppendorf glas og bæta DMSO við svo lokastyrkur þess væri 10% (v/v) og geyma í frysti við -80°C . Vöxtur bakteríunnar var mældur með gleypnimælingu við 600 nm. Sérætislausn var útbúin fyrir efnarafal. Hún innihélt hvorki þekktan rafeindagjafa né rafeindaþega bakteríunnar. Í um það bil 1,6 L af vatni voru sett 0,40 g af NH_4Cl ; 0,16 g af KCl ; 0,92 g af $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ og 4,0 g af NaHCO_3 . Sú lausn var gerð súrefnisfirt með því að blása í gegnum hana í um 2 klst. gasblöndu sem innihélt 5% koldíoxíð og 95% köfnunarefni. Lausnin var sett í autoklava. Að lokum var bætt út í 16 ml af CaCl (10 g/L) lausn, 1,6 mL af selenít-tungsten og 1000x „trace mineral“ blöndu og 3,2 mL af 500x vítamínblöndu. Sýrustig var svo stillt í kringum $\text{pH} = 7$ með 1 M HCl (saltsýru) eða 1 M NaOH (vítissóða). Fylgiskjöl með frekari upplýsingum um blöndun ætis má finna aftast í verkefninu.

2.2 Súlfíðmælingar

Við súlfíðmælingar var unnið eftir þekktri aðferð sem byggir á notkun metýlen blás (Cline, 1969). Magngreiningin byggir því á gleypnimælingu. Blönduð var hvarflausn sem innihélt 4 g/L af N,N-dímetýl-p-phenýlenedíamínsúlfati og 6 g/L af járnklóríði ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Blandaðir voru 50 mL af lausninni í einu. Efnunum var blandað út í vökva sem var samsettur úr 37% saltsýru (HCl) og súrefnissnauðu milliQ-vatni í hlutföllunum 1:1 (50% HCl á móti 50% súrefnissnautt vatn). Losnað var við súrefni úr lausnum með því að leyfa köfnunarefni að streyma um þær (um 1 klst. á líter). Sýrustig hefur mikil áhrif á hvaða form súlfíðs er ráðandi í lausn. Við sýrustig lægra en $\text{pH} = 6$ er stæstur hluti á formi H_2S við sýrustig á bilinu $\text{pH} = 6-8$ er það blanda af H_2S og HS^- . Við sýrustig $\text{pH} = 8-12$ er það að mestu leyti á formi HS^- og við sýrustig hærra en $\text{pH} = 13$ fer mest fyrir S^{2-} . Til að gleypnin fylgi lögmáli Beer voru allir staðlar og sýni þynnt 300-falt. Súrefnissnautt afjónað vatn var útbúið með því að fylla 2 L

flösku af milliQ-vatni og láta síðan köfnunarefni flæða um vökvann í um 2 klst. eða um 1 klst./1L. Af þessu loftfirra vatni voru 149,5 mL færðir í 250 mL lokuð glös. Sýni (0,5 mL) var bætt út í og blandað varlega með því að velta glasinu. Eftir um 5 mínútur var 1 mL af lausninni bætt við 1 mL af hvarfefnalausn sem sett var í 2 mL Eppendorfglas. Gleypnin var svo mæld við 670 nm eftir 20 mínútur (20-25). Staðlar voru útbúnir með natríum súlfíð (Na_2S) á bilinu 1 mM - 20 mM. Sýni úr efnarafli voru fryst en staðlar voru ekki frystir. Þess vegna varð til kerfisbundin skekkja á þann veg að mælingar sýndu lægri styrk en raunverulega var til staðar. Lagt var upp með í fyrstu að mæla súlfíð beint úr efnarafli en frá því var horfið til að halda tímaáætlun verkefnisins. Strax þegar fyrstu mælingar á súlfíðstyrk efnarafalsins voru gerðar varð ljóst að styrkur súlfíðsins hafði lækkað í sýnunum. Því mældist í raun minna súlfíð í efnaraflinum en var til staðar. Þetta ætti að leiða til ofmats á afkastagetu bakteríunnar við að mynda sulfat. Önnur ástæða kann að stuðla að skekkju mælinga í þessa átt. Natríum súlfíð er mjög basískt og magnmæling súlfíðs er mjög háð sýrustigi. Ekki var leiðrétt fyrir sýrustigi við stöðlun en því hærra sem sýrustig er því meira ætti að mælast af súlfíði. Í fyrstu var talið að 300-föld þynning kæmi í veg fyrir þau áhrif sem mismunandi sýrustig hefði og því skipti ekki máli þó sýni væru mæld við sýrustig um (eða rétt rúmlega) $\text{pH} = 7$. Þegar betur er að gáð sést að natríum súlfíð er of basískt til að það dugi. Í framtíðinn þyrfti t.d. að staðla við $\text{pH} = 7$ eða að meðhöndla bæði staðla og sýni með basa til að koma öllu súlfíði á form S^{2-} . Þannig fengist sem nákvæmust magnmæling súlfíðs. Þar sem eins var farið að í báðum hlutum tilraunarinnar þ.e. bæði við notkun Na_2S og H_2S ætti innbyrðis samanburður að vera góður og gildur. Til að sjá hversu mikið súlfíð tapaðist og eins til að fá betri mynd af raunverulegri afkastagetu *D. propionicus* var ákveðið í seinni keyrslunni, þar sem unnið var með brennisteinsvetni (H_2S) af háhitasvæðum, að gera fjórar súlfíðmælingar þar sem mælt var beint úr efnarafli án frystingarskrefsins. Sýni (0,5 mL) voru þá færð úr anóðuhluta efnarafalsins í 149,5 mL af súrefnissnauðu milliQ-vatni og sýnið síðan mælt eins og áður var lýst. Í framtíðinni verður súlfíð mælt beint úr efnarafli en ekki geymt.

2.3 Súlfatmælingar

Við súlfatmælingar var í fyrstu farið eftir sömu aðferð og lýst var í grein eftir Gong o.fl. frá 2013 (Gong et al., 2013). Aðferðin byggir á útfellingu sulfats með notkun BaCl_2 . Lausnin verður skýjuð. Gleypni hennar við 500 nm er mæld eftir að skýmyndun hefur náð jafnvægi. Agarósi er notaður til að halda baríumsulfatinu á floti í lausninni. Aðferðin eins og henni er lýst í greininni útheimti of mikla þynningu staðla. Staðalkúrfa varð því ónákvæm og í raun ónothæf. Til að glöggva sig á hverju mætti breyta var grunnheimild skoðuð betur (Jackson og McCandless, 1978). Sú aðferð sem þar var lýst er einfaldari en sú sem Gong o.fl. nota. Í

upprunalegu heimildinni var 1,1 mL af sýni bætt við 1,2 mL af 8% þríklórediksýru (TCA). Ekki var tekið fram hvað 8% TCA nákvæmlega þýddi en ákveðið var að blanda eftir þyngd/rúmmáli (w/v). Að lokum var 0,6 mL af lausn sem innihélt 25 mM baríumklóríð (BaCl_2) og 0,01% agarósa bætt við og gleypnin mæld eftir 35 mín. Sýrustig þessarar blöndu var mælt og reyndist $\text{pH} = 1,12$. Þessi þynning sýnis var mun minni en hjá Gong o. fl. í grein frá 2013. Til að minnka þynninguna enn frekar, en fá fram svipað sýrustig, var 1 M saltsýru (HCl) skipt út fyrir 8% TCA. Nú var reynt að blanda saman 0,5 mL af sýni, 0,1 ml af 1 M HCl og 0,4 mL af hvarfefni sem innihélt 25 mM BaCl_2 og 0,01% agarósa. Eftir þessa breytingu varð gleypnin mun hærri. Í ljós kom að staðalkúrfan bjagaðist með tíma á þann hátt að hallatalan minnkaði og hún skar ekki lengur núllpunktinn heldur var fyrir ofan hann. Í raun má segja að gleypni staðla með lágan styrk hafi vaxið með tíma en gleypni staðla með háan styrk lækkað. Þessi breyting í gleypni var þó ekki í réttu hlutfalli við styrk svo að gleypni staðla með lágan styrk hækkaði hlutfallslega miklu meira með tíma. Skýringar á þessu geta verið margs konar og flóknar. Jafnvægi myndunar og tvístrunar jónanna í lausninni hafa örugglega talsvert að segja. Agarósi inniheldur súlfat en þar sem styrkur hans var lágur hefur slíkt varla haft mikil áhrif. Engu að síður fengust ágætis staðalkúrfur eftir einnar og tveggja mínútu bið. Enn var þó helst til mikil skekkja á mælingum staðla. Oftast fékkst góð lína fyrir hvern staðal fyrir sig en of mikill munur var á þeim innbyrðis. Hvernig sýnið er blandað eða hrist hefur mikil áhrif á mælinguna og erfitt getur verið að fullkomna handtökin og koma í veg fyrir skekkju af mannavöldum. Annar ókostur sem fólst í þessari leið var að mæla þurfti eitt sýni í einu. Þar sem tæki voru fyrir hendi til þess að notast við 96-holu bakka og þannig smækka uppskriftina var það prófað. Þannig má t.d. hrista sýnin tölvustýrt og mörg sýni eru ásamt staðalkúrfu mæld á sama tíma og við sömu aðstæður. Bæði var prófað að nota agarósa og að sleppa honum þar sem ekki var talin þörf á honum því ljósi er skotið í gegnum botn brunnsins við mælingar. Notkun agarósa kom betur út. Þessi leið gaf nokkuð góða raun og því var ákveðið að nota hana. Út í hvern brunn var blandað saman 150 μL af sýni eða staðli, 30 μL af 1M HCl, og 90 μL af hvarfefni. Þessi lausn hafði sýrustig $\text{pH} = 1,22$. Þar sem aukin viðbót HCl getur minnkað gleypnina (Jackson og McCandless, 1978) var fallist á þetta sýrustig. Bakkinn var hristur í nokkrar sekúndur á hristibakka/plötu og síðan settur í ljósgleypnimælinn. Þar var mæling tekin á mínútu fresti. Fyrir fyrstu mælingu var bakkinn hristur tölvustýrt í 5 sekúndur en í seinni mælingum var enginn hristingur. Sá tími sem gaf besta staðalkúrfu var síðan notaður. Ýmislegt í lausn efnarafals kann að hafa áhrif á gleypnimælingu við 500 nm. Súlfat er vel uppleysanlegt. Sýni og staðlar voru því spunnin (upp í 20.238 xg) fyrir mælingu til að lágmarka skekkju.

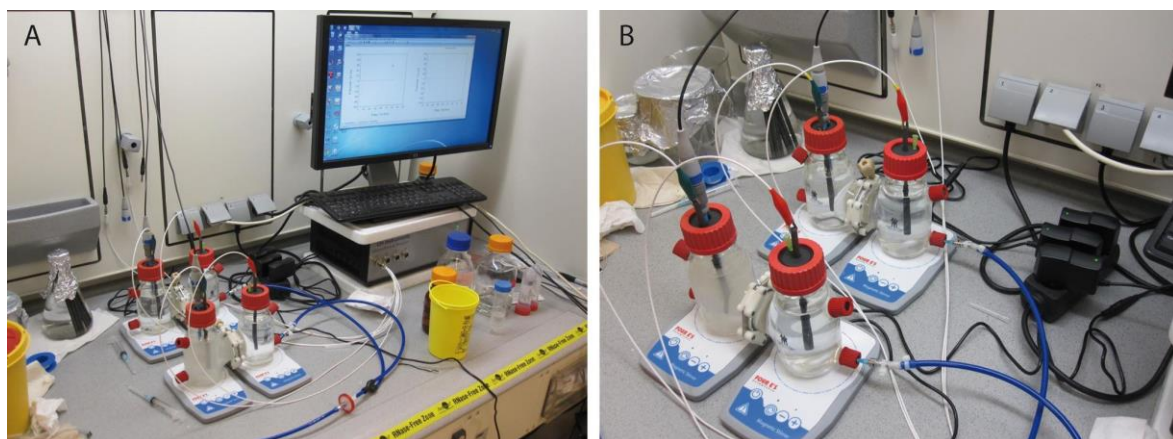
2.4 Brennisteinsvetni af háhitasvæðum

Farið var að Helligheitdarmarkjun til að ná í skiljuvatn (niðurdælingarvatn) úr niðurdælingarstöð. Vatnið var leitt úr niðurdælingarröri í gegnum slöngu og í flöskur. Ein 250 mL flaska og tvær 1000 mL voru fylltar. Reiknað var með að um 2400 ppm af brennisteinsvetni og um 4400 ppm af koldíoxíði hafi verið í niðurdælingarvatninu. Það samsvarar um 70 mM af brennisteinsvetni (H_2S) og um 100 mM af koldíoxíði (CO_2). Vatnið var undir tæplega 8 atm þrýstingi og var ca. 20-22 °C. Jafnframt komst það að einhverju leyti í snertingu við súrefni í andrúmslofti. Allir þessir þættir gera að verkum að líklegt var að umtalsvert tapaðist af brennisteinsvetninu. Flöskunum var lokað með venjulegum skrúfutöppum og þær keyrðar í bæinn þar sem skrúfutöppunum var skipt út fyrir gúmmítappa til að hindra að súrefni kæmist að. Súrefni hvarfast við sulfíð í vatnslausn og myndar brennistein (S^0). Flöskurnar voru geymdar í kæli. Eftir að gúmmítappar voru settir á voru flöskurnar ekki opnaðar aftur heldur var nál og sprauta notuð til að ná lausninni úr flöskunum. Þegar nota þurfti mikið rúmmál lausnar var yfirþrýstingi köfnunarefnis komið fyrir í flöskunni og þannig mátti auðveldlega ná vökvanum út.

2.5 Uppsetning efnarafals

Notaðir voru tveir efnaraflar í hvorri keyrslu. Annar innihélt bakteríuna en hinn var viðmið án bakteríu. Efnaraflarnir voru keyptir frá Adams & Chittenden Scientific Glass. Sívalningslaga grafitstangir frá SGLcarbon GmbH voru notaðar sem rafskaut. Þvermál þeirra var 6 mm og lengdin 120 mm. Nýjar elektróður voru lagðar í saltsýru (HCl) í 1 klst. og síðan í vatn í 1 klst. og að lokum í vítissóða (NaOH) í 1 klst. Notaðar elektróður voru lagðar í saltsýru í að minnsta kosti 1 klst. og því næst í vatn í sólarhring hið minnsta. Prótónuskiptahimna frá Sigma Aldrich var klippt út. Himnan var hringlaga með þvermál 5,1 cm (5,0 cm hefði líklega verið nóg). Flatarmál snertiflatar himnu og vökva var um 12,5 cm². Áður en himnan var klemmd á milli anóðu- og katóðuklefanna var hún soðin í afjónuðu vatni í 3 klst. (við það þenst hún út). Afjónuðu vatni var komið fyrir í kerfinu og það síðan dauðhreinsað í autoklava án viðmiðunarelektróða (frá Mettler Toledo). Viðmiðunarelektróðurnar eru geymdar í 3 M KCl lausn. Þær voru hreinsaðar með vatni í lok hverrar keyrslu og leyft að liggja í 1 M HCl í 2-5 mínútur. Að lokum voru þær þurrkaðar með etanóli áður en þeim var komið fyrir í efnaraflinum. Sérstök ætislusn fyrir efnarafal var blönduð og 300 ml af henni komið fyrir í hvort hólf efnarafals á dauðhreinsaðan (sterílan) hátt í frumuræktunarskáp. Hvor keyrsla innihélt eitt kerfi með bakteríu og eitt án hennar. Í keyrslu með natríum sulfíði (Na_2S) var efnaraflinum komið fyrir á segulhrærum, hann tengdur og 300

mV spenna sett á kerfið. Bakteríu var komið fyrir anóðumegin áður en um 3 mL af súlfíði var sprautað þar inn. Í seinni keyrslu þar sem notast var við virkjunarvatn var ætislausn blönduð í hærri styrk. Styrkurinn samsvaraði þynningunni við virkjunarvatnið þannig að lokastyrkur allra efna á að vera nánast sá sami. Virkjunarvatninu var komið fyrir anóðumegin í efnaröflunum. Þeim var síðan komið fyrir á segulhrærum og tengdir. Að lokum var bakteríu komið fyrir anóðumegin og 300 mV spenna sett á kerfið. Í báðum tilfellum voru notaðar tvær ræktunarflöskur í efnarafal. Bakteríurnar voru spunnar niður (2500 xg, 15 mínútur og 7 °C) og síðan þvegnar með ætislausn efnarafals til að losa þær við súlfíð sem safnast upp í ræktunarflöskunum. Þær voru spunnar aftur og bætt út í anóðuklefa efnarafals (5-10 mL). Katóðumegin var stöðugum straumi köfnunarefnis leyft að flæða um lausnina til að ekki söfnuðust fyrir lofttegundir katóðumegin í háum styrk sem gætu hindrað framgang hvarfsins. Ráðgert var að mynda vetni katóðumegin þar sem prótónur sem losnuðu anóðumegin flæddu í gegnum prótónuskiptahimnu og að anóðu þar sem þær myndu afoxast í vetni (H₂). Ólíklegt kann þó að vera að þetta hvarf hafi átt sér stað þar sem vetnismyndun við sýrustig pH = 7 þarf spennu upp á -410 mV (Rabaey og Rozendal, 2010) Engu að síður gaf besta raun að hafa stöðugt köfnunarefnisflæði við katóðuna. Uppsetningu kerfisins má sjá á mynd 2. Þar sem *D. propionicus* á erfitt með að binda koldíóxíð var própíonati bætt út í efnarafal sem kolefnisuppsprettu. Styrkurinn var hafður mjög lágur eða 100 µM til að lágmarka áhrif própíonats sem rafeindagjafa. Áætlað var að vinna með um 10 mM styrk í kerfunum. Þannig var um 3 mL af 1 M natríum súlfíði (Na₂S) bætt út í anóðu efnarafalsins. Virkjunarvatnið var þynnt út í ætislausn til að ná fram sama styrk.



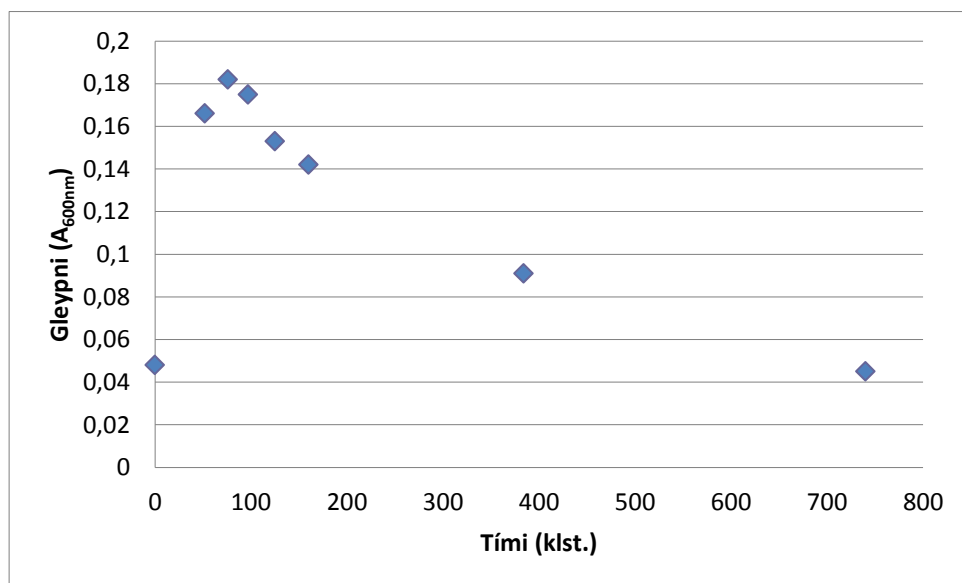
Mynd 2. Uppsetning efnarafals.

(A) Heildaruppsetning kerfanna. (B) Vinstra skautið er anóða (blátt) og hægra skautið katóða (rautt).

3 Niðurstöður og umræða

3.1 Bakteríuræktun

Í fyrri keyrslu voru notaðar bakteríur sem geymdar voru í frysti frá síðasta sumri. Þær voru síðan aftur frystar og notaðar nokkrum mánuðum seinna í síðari keyrslu með virkjunarvatni. Einu sinni gerðist það að bakterían ræktaðist ekki upp af ætinu. Þá var nýtt æti blandað strax og engin frekari vandræði komu upp. *D. propionicus* hafði verið ræktuð upp við Kerfislíffræðisetur HÍ síðasta sumar. Ræktun gekk betur að þessu sinni. Líklega af því að ferskar ætisláusnir voru blandaðar og meiri reynsla var til staðar. Mæld hámarksgleypni mismunandi rækta við 600 nm var frá 0,145-0,222. Dæmi um vaxtarkúrfu bakteríunnar við 37 °C má sjá á mynd 3.



Mynd 3. Dæmi um vaxtarkúrfu *D. propionicus*.

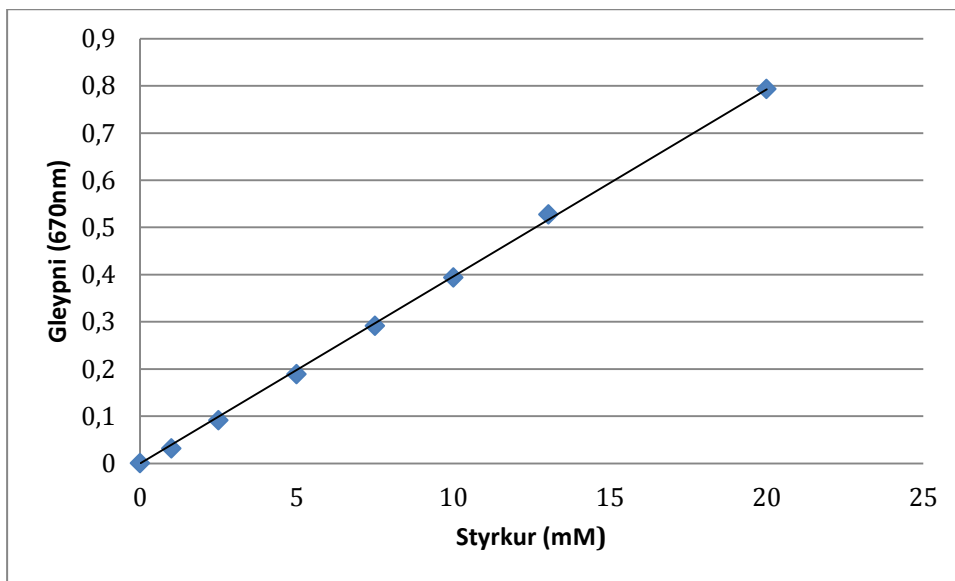
Á grafinu sést dæmi um vaxtarkúrfu *D. propionicus* (tekið úr flösku 3A) við 37 °C.

Á mynd 3 sést að bakterían nær hámarksvexti eftir um þrjá sólarhringa. Henni hrakar svo hægt og rólega og eftir 16 sólarhringa er hún greinilega deyjandi. Ef hrist var upp í ræktunarflöskunni á þessum tímapunkti gat gleypnin sýnt gildi svipuð þeim sem mældust þegar bakterían var í miklum vexti. Mögulega er um að ræða útfellingar efna í lausninni sem þannig geta skekkt mælingu. Annar möguleiki er að bakterían klumpi sig saman (Alvarez et al., 2008). Slíkt þekkist sem varnarviðbrögð sumra deyjandi baktería. Þannig geta lifandi

frumur nærst á dauðum og mögulega verndað sig frá eitrefnum í lausninni. Eftir að hrist var upp í flöskunni mældist gleypnin við 600 nm í nokkurn tíma stöðug í um 0,09. Eftir um mánuð var bakterían þó greinilega dauð. Þykkar gróðurlíkar flyksur sátu fastar á botninum og gleypni mældist lægri en upphafsgleypni.

3.2 Súlfíðmælingar

Styrkur súlfíðs var mældur með meþýlen blátt aðferðinni (Cline, 1969). Mynd 4 sýnir staðalkúrfu sem fékkst.



Mynd 4. Staðalkúrfa súlfíðmælinga.

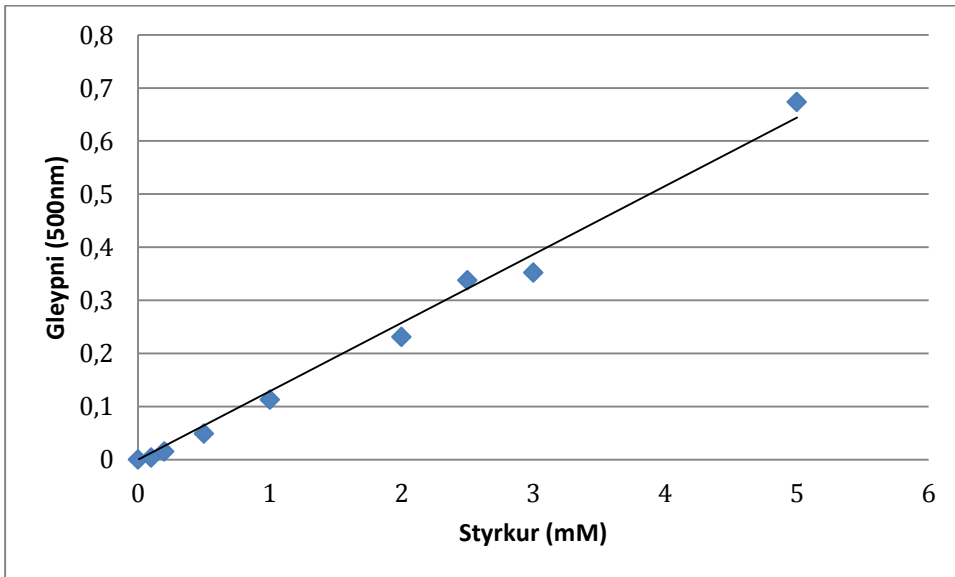
Jafna bestu línu er: $y = 0,0396x$. Staðalfrávik er $0,0022x$ og $r^2 = 0,9993$.

3.3 Brennisteinsvetni af háhitasvæðum

Magn súlfíðs í virkjunarvatni frá Hellisheiði var mælt. Magnið í flösku 1 (250 mL flöskunni) reyndist um 21,5 mM. Magnið í flöskum 1 og 2 (1 L flöskunum) mældist annars vegar 29,8 mM og hins vegar 28,8 mM. Þar sem sýrustig hefur áhrif á mælingu er mögulegt að raunverulegur styrkur hafi verið aðeins hærri en mældur styrkur. Samkvæmt starfsmanni Hellisheiðarvirkjunar voru um 2400 ppm af brennisteinsvetni (H_2S) í virkjunarvatninu. Það samsvarar um 70 mM styrk af H_2S . Um helmingur þess hefur því losnað úr lausninni við meðhöndlun. Virkjunarvatn úr flösku 2 var notað í efnarafal. Sýrustig þess var pH = 4,09.

3.4 Súlfatmælingar

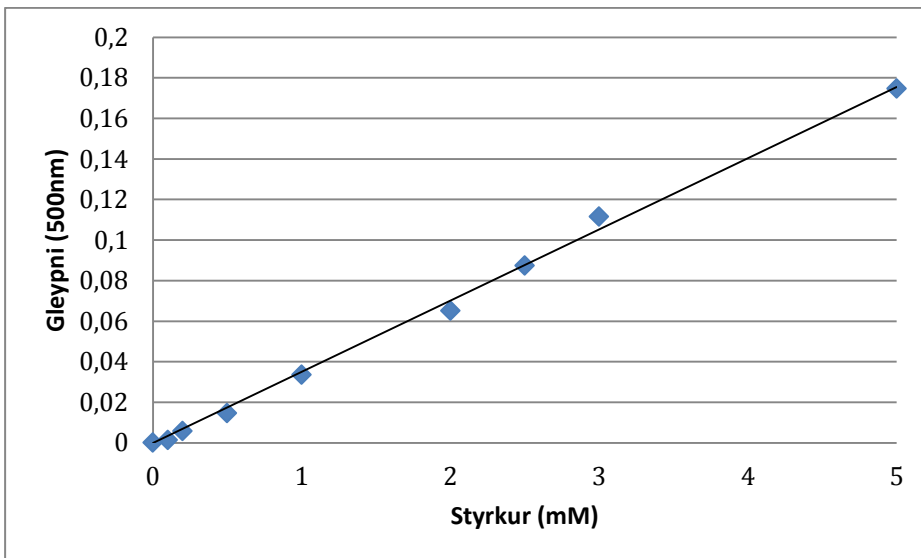
Tvær leiðir voru þróaðar fyrir súlfatmælingar. Önnur byggði á mælingu á einu sýni í einu í 1 mL kúvettu (1,5 mL). Hin byggði á mælingu á mörgum sýnum samtímis í 96-holu bakka. Staðalkúrfu sem byggði á mælingu eins sýnis í einu má sjá á mynd 5.



Mynd 5. Fyrri staðalkúrfa súlfatmælinga.

Jafna bestu línu er $y = 0,1289x$. Staðalfrávik er $0,031x$ og $r^2 = 0,991$.

Aðferðin gefur gleypni á góðu bili en hún er seinleg, krefst mikillar mannlegrar nákvæmni á milli mælinga og staðalfrávik er fremur hátt. Því var reynt að bæta mæliaðferðina. Dæmi um staðalkúrfu með seinni aðferðinni má sjá á mynd 6.



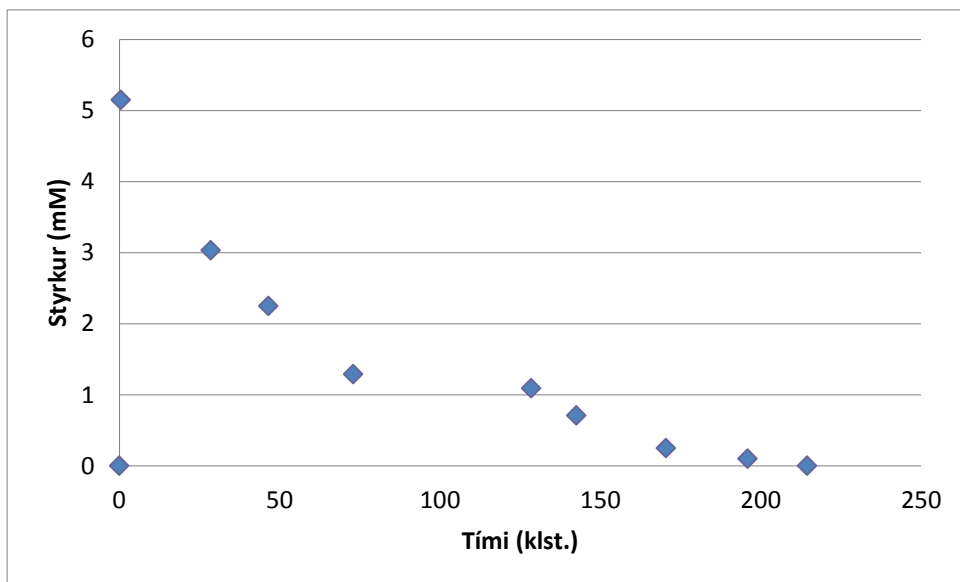
Mynd 6. Seinni staðalkúrfa súlfatmælinga.

Jafna bestu línu er $y = 0,0351x$. Staðalfrávik er $0,0047x$ og $r^2 = 0,9971$.

Gleypnibilið er hér talsvert minna. Leiðin er engu að síður fljótvirkari, gefur hlutfallslega lægra staðalfrávik og hefur þann kost að staðalkúrfa er mæld á sama augnabliki og sýnin. Staðalkúrfa var tekin á mínutu frest og var sú sem sést á mynd 6 fengin fjórum mínútum eftir að hvarfefni var blandað við sýni og staðla. Ágæt staðalkúrfa fékkst frá tveimur mínútum til tveggja klukkustunda hið minnsta. Við magnmælingar súlfats var stuðst við þessa og sambærilegar staðalkúrfur þar sem staðalkúrfa var fundin í hvert sinn sem mælingar fóru fram.

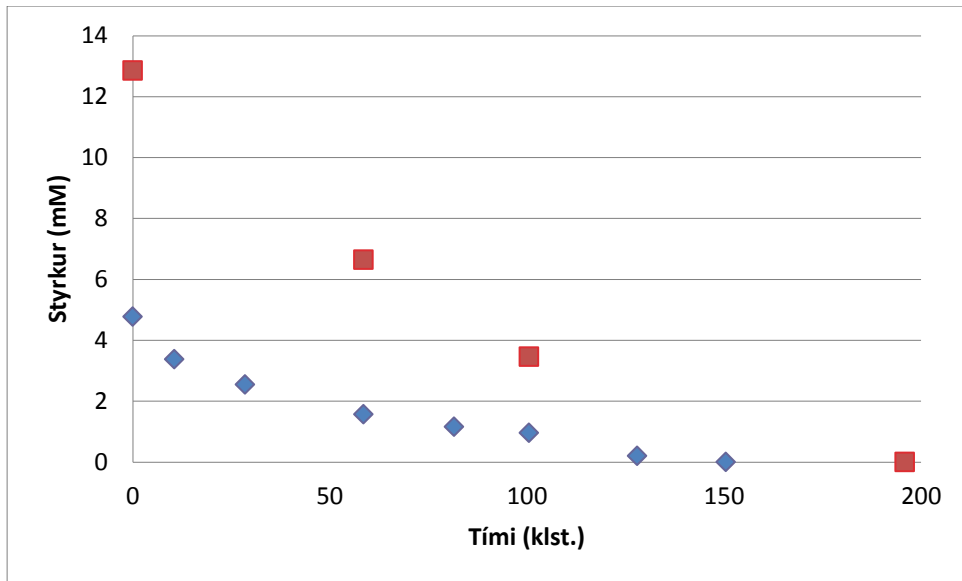
3.5 Mælingar á lausn efnarafals

Mælingar voru gerðar á súlfíðmagni í anóðuklefa efnarafla. Á mynd 7 sést súlfíðmagn í efnarafli með bakteríu eftir að natríum súlfíði var bætt út í (við 0,5 klst.).



Mynd 7. Súlfíðmagn í efnarafli með bakteríu og natríum súlfíð innspýtingu.

Sambærileg súlfíðmæling var gerð á keyrslu með virkjunarvatn af Helligheiði sem súlfíðgjafa. Mælingar þess kerfis má sjá á mynd 8. Hluti súlfíðs losnar úr sýnum við frystingu. Þess vegna voru fjögur sýni tekin til mælinga beint úr efnarafli. Þau voru sett beint í 300-falda þynningu í súrefnissnauðu vatni. Styrkur í þeim sýnum gæti mælst of hár þar sem staðlar standa í glerglösum í nokkurn tíma en þessi sýni fóru beint í þynningu úr loftfirrtum efnarafli. Til að líkja eftir stöðlun væri ef til vill betra að færa sýni í Eppendorf glös og þaðan í 300-falda þynningu. Súlfíðmælingar bæði frystra sýna og sýna beint úr kerfi má sjá á mynd 8.

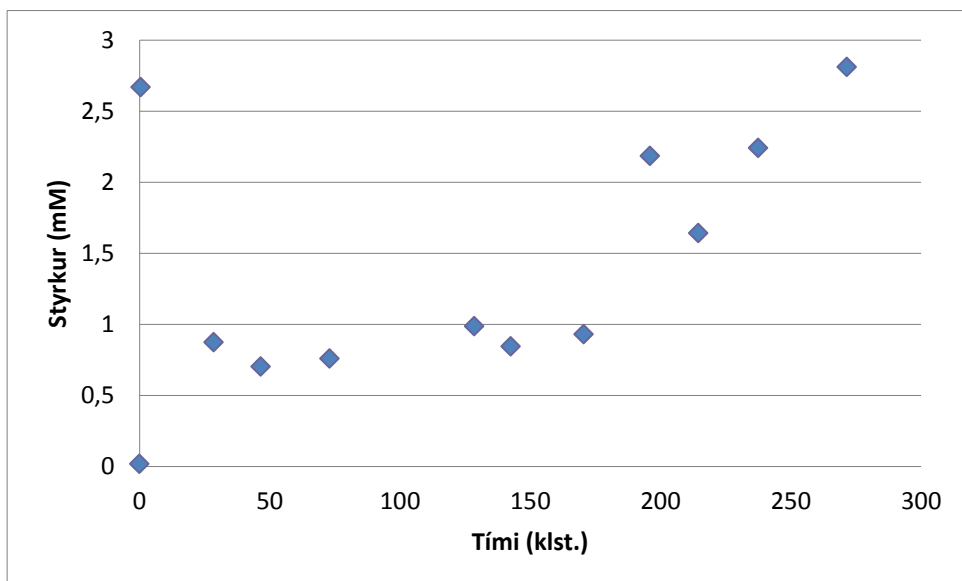


Mynd 8. Súlfiðmagn í efnarafli með bakteríu og virkjunarvatni.

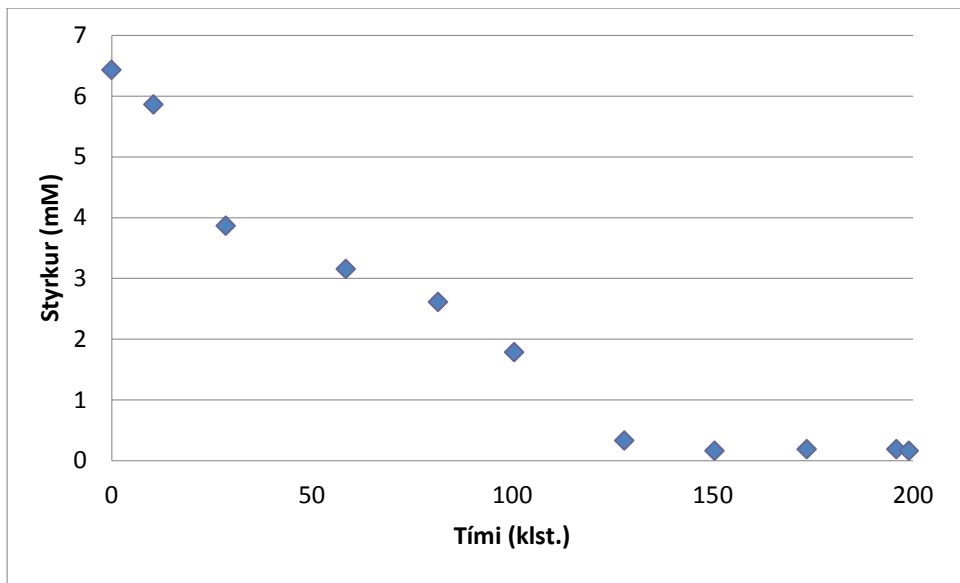
◆ tákna fryst sýni og ■ tákna ófryst sem fóru beint í mælingu.

Myndin gefur til kynna hversu vandasöm súlfiðmælingin er. Engu að síður verður að teljast líklegt að raunverulegur upphafsstyrkur súlfiðs í kerfinu sé nálægt 10 mM eins og lagt var upp með. Sem dæmi mælist svipaður styrkur í öllum kerfum og upphafsstyrkur í kerfum með natríum súlfið sem súlfiðgjafa ætti að vera nokkuð nálægt 10 mM þar sem þekkt magn af 1 M Na_2S blöndu var notað.

Súlfatmælingar kerfis með natríum súlfiði og bakteríu má sjá á mynd 9 og súlfatmælingar kerfis með virkjunarvatni og bakteríu má sjá á mynd 10.

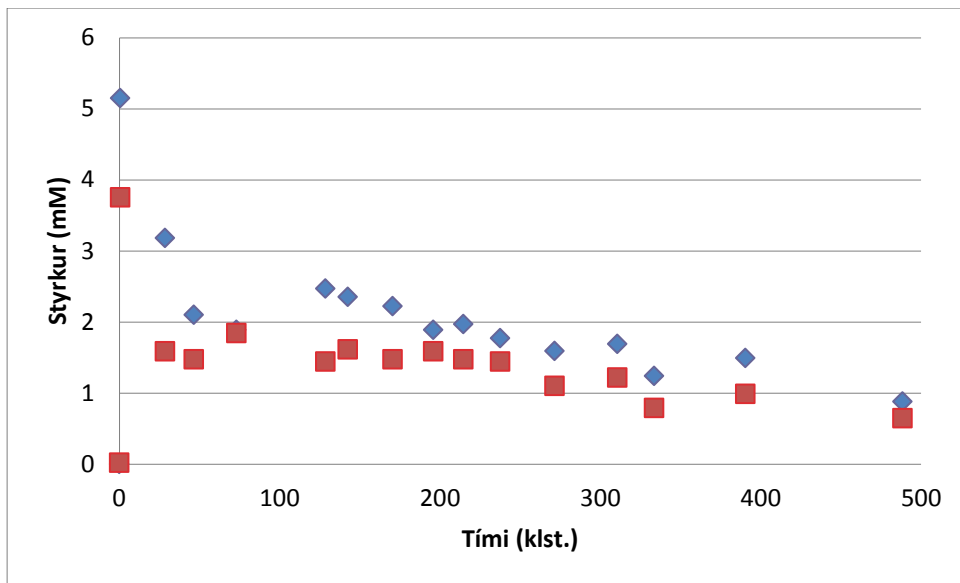


Mynd 9. Súlfatstyrkur kerfis með bakteríu og Na_2S sem súlfiðgjafa.



Mynd 10. Súlfatstyrkur kerfis með bakteríu og virkjunarvatn sem súlfíðgjafa.

Niðurstöður eru við fyrstu sýn á skjön við það sem ætla mætti. Í byrjun á ekkert súlfat að vera í kerfinu en svo ætti það að hækka smám saman með tíma með aðstoð bakteríunnar. Í keyrslu með virkjunarvatni mælist mjög hár styrkur súlfats í upphafi. Svo hár raunar að hann nær ekki inn á staðalkúrfu. Hann lækkar síðan þar til að við um 200 klst. er ekkert eftir. Í keyrslu með natríum súlfíði mælist enginn styrkur í byrjun en um leið og natríum súlfíði var bætt út mælist gríðarleg aukning í styrk súlfats. Styrkurinn lækkar svo og helst þar óbreyttur þar til um 170 klst. voru liðnar af keyrslu. Eftir það sýna mælingar aukningu í styrk. Niðurstöður benda til að súlfíð ($-S^{2-}$) sem til staðar er rugli mælingu súlfats (SO_4^{2-}). Þetta sést enn betur á viðmiðunarkeyrslu með natríum súlfíði. Í þeirri keyrslu varð það óhapp að vír losnaði af elektróðu og því var kerfið ekki tengt í nokkurn tíma. Brennisteinn hafði þá tíma til að setjast á skautið. Þegar kerfið var tengt aftur hefur of mikill brennisteinn verið sestur á skautið til að allt súlfíð í kerfinu næði að oxast. Hefði *D. propionicus* verið til staðar hefði hún getað étið brennisteininn af og hvarfið haldið áfram. Í fyrstu var litið á þessa keyrslu sem ónýta en þegar betur var að gáð sést að hún gefur góða vísbendingu um að styrkur súlfíðs í kerfi hafi áhrif á mældan styrk súlfats. Til að sannreyna þetta voru útbúnir súlfíðstaðlar og þeir notaðir til að búa til staðalkúrfu með súlfatmæliaðferðinni. Súlfatmæliaðferðin gaf góða staðalkúrfu súlfíðs. Þar með var staðfest að súlfíð skekkir súlfatmælingu. Mynd 11 sýnir mældan styrk súlfíðs og súlfats í viðmiðunarkeyrslunni.



Mynd 11. Mældur súlfíðstyrkur og súlfatstyrkur viðmiðunarkeyrslu með natríum súlfíði.

Greinilega sést hvernig mælingarnar tvær fylgjast að. ♦ tákna sulfíðstyrk og ■ tákna sulfatstyrk.

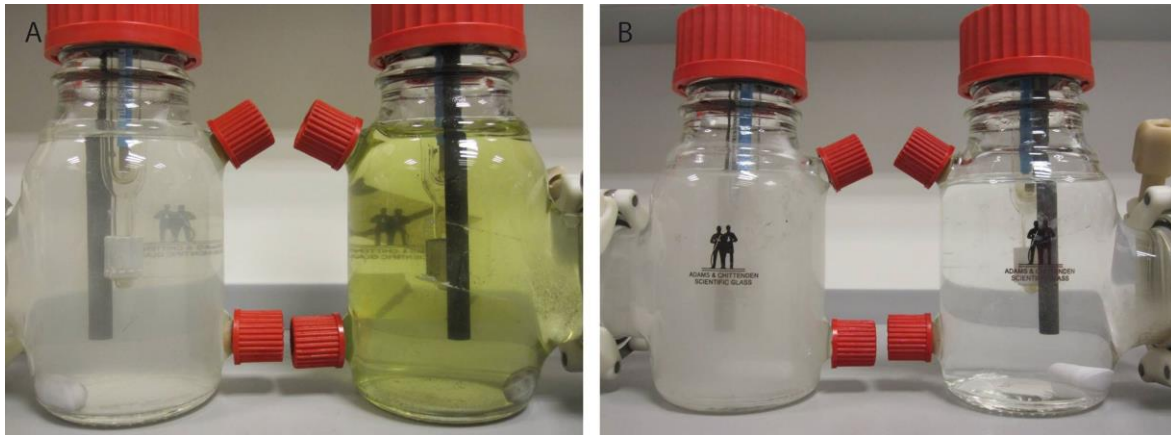
Vitað er að við þær aðstæður sem voru til staðar í efnarafninum (300 mV) á ekkert sulfat að myndast. Þetta hafa fyrri rannsóknir sýnt (Gong et al., 2013; Holmes et al., 2004). Því má ætla að það sulfat sem mælist í viðmiðunarkeyrslu sé allt af völdum sulfíðs sem truflar mælingu (ef til vill baríum sulfíð að myndast). Ennfremur sést að sulfatstyrkur hækkar ekki aftur líkt og í keyrslu með bakteríu heldur minnkar stöðugt með sulfíðinu. Því má gera ráð fyrir að ekkert sulfíð hafi myndast í viðmiðunarkeyrslu. Mældur styrkur sulfats í keyrslu með virkjunarvatni og bakteríu er hár til að byrja með en lækkar svo með minnkandi sulfíðstyrk. Eftir um 150 klst. mælist hvorki neitt sulfíð né sulfat. Ekkert sulfat hefur því myndast í þessari keyrslu. Viðmiðunarkeyrsla fyrir virkjunarvatn án bakteríu leit nánast alveg eins út. Við lok þeirrar keyrslu mældist hvorki sulfat né sulfíð í kerfinu. Brennisteinsvetnið úr virkjunarvatninu hefur enn meiri áhrif á sulfatmælingarnar en natríumsulfíðið. Ekki er vitað af hverju þetta stafar en mögulega hefur sýrufasti efnanna eitthvað með það að gera.

Þar sem ekkert sulfíð var til staðar eftir um 200 klst. í efnarafli með bakteríu og natríum sulfíði má gera ráð fyrir að það sulfat (SO_4^{-2}) sem mælist eftir þann tíma sé ekki skekkt af sulfíði (S^{-2}). Eftir 271,5 klst. eða rúma ellefu sólarhringa mældist 2,8 mM styrkur sulfats. Sé miðað við áætlaðan upphafsstyrk 10 mM þýðir þetta að um 28% sulfíðsins hvarfast yfir í sulfat með aðstoð *D. propionicus*. Til að sannreyna þessar mælingar og fá öryggisbil á þær voru mælingar á sýnum endurteknar. Það var gert viku eftir þær fyrri. Aðeins var merki um

súlfatmyndun í keyrslu með natríum súlfíði og bakteríu. Þær mælingar voru þó vafasamar. Ástæða þess er sú, að styrkur súlfats mældist stöðugt hærrí eftir því sem lengra leið á mælingarnar. Þ.e. því lengri tími sem leið frá því að hvarfefni var blandað saman við sýni því hærrí styrkur mældist í því. Þessu var ekki svo farið í fyrri mælingu. Lítið er því hægt að lesa úr seinni mælingum varðandi raunverulegt súlfatmagn sýnanna. Hins vegar benda mælingarnar til að súlfat sé til staðar í lok keyrslu með bakteríu og natríum súlfíði eins og fyrri mælingar sýndu. Vinna þarf því enn betur að því að bæta mæliaðferðina. Sýnin voru geymd yfir vikutímabil annars vegar við herbergishita og hins vegar í kælikáp. Vel má vera að þau hafi á einhvern hátt skemmst á þessu tímabili. Jafnframt var lítið eftir af sýni í sýnaglösum og því möguleiki að eitthvað af því sem spunnið var niður geti slæðst með í mælingu. Talsverður tími virðist líða frá því að súlfíði er bætt út í kerfið og þangað til súlfatstyrkur hækkar. Þetta er sambærilegt við reynslu fyrri rannsakenda (Gong et al., 2013). Möguleg ástæða fyrir þessu er að súlfatafoxarar safna súlfatbirgðum (Cypionka, 1995). Vegna þeirrar spennu sem var á kerfinu og að enginn hentugur rafeindagjafi var til staðar getur bakterían ekki notað súlfatið sem rafeindaþega við þessar aðstæður. Hún er þó engu að síður líkleg til að safna því upp. Ef til vill fer súlfat ekki að mælast í háum styrk fyrr en bakteríur á örveruþekju rafskautsins eru deyjandi og rofna.

Niðurstöður rannsóknarinnar eru því að bakterían myndaði súlfat með aðstoð rafskauts og natríumsúlfíðs en ekkert myndaðist þegar virkjunarvatn var notað. Tilgáta rannsóknarinnar stóðst því ekki. Hafa verður í huga að aðeins er um eina keyrslu að ræða þar sem margt getur farið úrskeiðis og því ber að forðast að alhæfa um þessar niðurstöður. Endurtaka þarf tilraunina margofter til að sjá hvort þessar niðurstöður standist.

Þar sem allt súlfíð hvarf úr báðum efnaröflum sem innihéldu virkjunarvatn mátti búast við að finna annað hvort súlfat eða brennistein í anóðuklefa efnaraflanna. Ekkert súlfat mældist. Hvorki í klefa með né án bakteríu. Því hefði mátt búast við að brennisteinn myndi safnast upp. Hvorug lausnin litaðist gul eins og viðmiðunarkeyrsla natríum súlfíð þar sem greinilegt var að brennisteinn safnaðist upp. Samanburð á anóðuklefum efnaraflanna má sjá á mynd 11.



Mynd 12. Samanburður á anóðuklefum efnaraflanna.

(A) Hér má sjá anóðuklefa efnaraflanna við lok keyrslu með natríum sulfíð sem sulfíðgjafa. Bakterían var vinstra megin og viðmið hægra megin. Greinilega hefur brennisteinn safnast upp í viðmiði. (B) Hér má sjá anóðuklefa efnaraflanna við lok keyrslu með virkjunarvatn sem sulfíðgjafa. Bakterían var vinstra megin og viðmið hægra megin. Engin augljós merki eru um brennistein.

Ekkert sulfíð mælist í klefum með virkjunarvatni í lok tilraunar en ekki er vitað á hvaða formi brennisteinsatómin halda sig. Þau virðast hvorki finnast á formi brennisteins né sulfats. Ólíklegt er að sulfíðið hafi losnað úr kerfinu með uppgufun því straummyndun í bakteríukeyrslunum var aðeins 22,5% lægri í virkjunarvatnskeyrslunni. Skýringin getur heldur varla verið sú að mikið súrefni hafi verið til staðar í anóðuklefunum. Súrefni í vatnslausn hvarfast við sulfíð og til verður brennisteinn (S^0) en engin merki fundust um hann. Líklegra er að í klefanum hafi myndast aðstæður þar sem sulfíð gat hvarfast við eitthvað af efnun lausnarinnar og myndað annars konar útfellingar. Hvítar útfellingar voru áberandi bæði bakteríumegin og í viðmiði.

4 Ályktanir og framtíð verkefnis

Sú nýja þekking sem hefur orðið til á sviði rafvirkra baktería síðustu ár gefur góð fyrirheit. Vaxandi áhersla hefur verið í samfélaginu á fullnýtingu þeirra hráefna sem unnið er með í iðnaði. Fiskiðnaðurinn á Íslandi hefur sem dæmi lagt mikið upp úr hámarksnýtingu hráefnis. Sú þekking sem skapast hefur á rafvirkum bakteríum sem notað geta rafskaut við orkuefnaskipti þýðir að hægt verður að nýta jafnvel úrgang sem annars þyrfti að farga til orkuframleiðslu. Þannig mætti sem dæmi virkja mengandi afrennslisvatn. Tæknin er ný og á enn langt í land með að vera skilvirk og arðbær. Einu dæmin um raunverulega nýtingu er í rafhlöðum á hafsbotni. Vinna þarf í uppskölun efnarafla og byggingu skauta og lögunar þeirra svo dæmi séu tekin (Logan, 2010). Jafnframt þarf að bæta vaxtarskilyrði baktería og auka framleiðslu þeirra á rafmagni eða lífefnum. Ólíkar vísindagreinar skarast því í slíku verkefni. Með samvinnu má gera svona framleiðslu að veruleika.

Í þessu verkefni var bakteríum í fyrsta skipti svo vitað sé gefið úrgangsvatn gufuvarmavirkjunar sem æti í efnarafal. Vonast var til að bakteríurnar gætu oxað brennistein sem kominn var frá brennisteinsvetni sem finnst í vatninu og afoxað rafskaut. Bakterían *D. propionicus* hafði áður sýnt að hún gæti afoxað rafskaut þegar súlfíði var bætt út í efnarafal við 300 mV spennu (Gong et al., 2013). Fyrstu niðurstöður eru neikvæðar og benda til að bakterían hafi ekki framkvæmt það hvarf sem ætlast var til af henni. Mælingar á súlfíði og sérstaklega sulfati eru mjög vandasamar. Mikil vinna hefur farið fram til að láta þær virka og enn á sulfatmælingin nokkuð í land. Í framtíðinni má reyna annars konar sulfatmælingar t.d. mælingar með aðstoð jónaskiptasúlu (Holmes et al., 2004). Þar sem aðeins er um eina keyrslu að ræða er varasamt að draga of stórar ályktanir. Margt getur farið úrskeiðis við framkvæmd tilraunar og ef til vill munu niðurstöður verða jákvæðari í framtíðinni eftir meiri endurtekningu. Ef þær verða það ekki mætti koma auga á hver vandamálin eru og sigrast á þeim með þekkingu og vilja að vopni. Til mikils er að vinna í þessum efnunum. Orkuframleiðsla úr skaðlegum úrgangsefnum með aðstoð lífvera er spennandi tilhugsun sem vonandi verður útbreidd er fram líða stundir.

Heimildir

- Alvarez, B., López, M.M., and Biosca, E.G. (2008). Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiol. Read. Engl.* *154*, 3590–3598.
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., and Lovley, D.R. (2002). Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* *295*, 483–485.
- Cline, J.D. (1969). Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Waters. *Limnol. Oceanogr.* *14*, 454–458.
- Cypionka, H. (1995). Solute Transport and Cell Energetics. In *Sulfate-Reducing Bacteria*, L.L. Barton, ed. (Springer US), pp. 151–184.
- Debabov, V.G. (2008). [Electricity from microorganisms]. *Mikrobiologija* *77*, 149–157.
- Edda S. P. Aradóttir. 2015. „Svo taka náttúruleg ferli við.” Stiklað á stóru í sögu CarbFix og SulFix. Vísindadagur Orkuveitu Reykjavíkur og Orku náttúrunnar.
- Embree, M., Qiu, Y., Shieu, W., Nagarajan, H., O’Neil, R., Lovley, D., and Zengler, K. (2014). The iron stimulon and fur regulon of *Geobacter sulfurreducens* and their role in energy metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 2918–2927.
- Garrity, G.M. (2001). *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology* (Springer Science & Business Media).
- Gong, Y., Ebrahim, A., Feist, A.M., Embree, M., Zhang, T., Lovley, D., and Zengler, K. (2013). Sulfide-driven microbial electrosynthesis. *Environ. Sci. Technol.* *47*, 568–573.
- Holmes, D.E., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004). Electron Transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and Graphite Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 1234–1237.
- Jackson, S.G., and McCandless, E.L. (1978). Simple, rapid, turbidometric determination of inorganic sulfate and/or protein. *Anal. Biochem.* *90*, 802–808.
- Kabil, O., and Banerjee, R. (2010). Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J. Biol. Chem.* *285*, 21903–21907.
- Logan, B.E. (2010). Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *85*, 1665–1671.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., and Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 5181–5192.

- Lovley, D.R. (2006). Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* *17*, 327–332.
- Lovley, D.R. (2008b). Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more. *Geobiology* *6*, 225–231.
- Lovley, D.R. (2008a). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr. Opin. Biotechnol.* *19*, 564–571.
- Lovley, D.R., and Coates, J.D. (2000). Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 252–256.
- Lovley, D.R., and Phillips, E.J.P. (1994). Novel Processes for Anaerobic Sulfate Production from Elemental Sulfur by Sulfate-Reducing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *60*, 2394–2399.
- Malvankar, N.S., and Lovley, D.R. (2014). Microbial nanowires for bioenergy applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* *27*, 88–95.
- Nagarajan, H., Embree, M., Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Feist, A.M., Palsson, B.Ø., Lovley, D.R., and Zengler, K. (2013). Characterization and modelling of interspecies electron transfer mechanisms and microbial community dynamics of a syntrophic association. *Nat. Commun.* *4*, 2809.
- Nelson David L. og Michael M. Cox. *Lehninger, Principles of Biochemistry*. Fifth edition. 2008. New York, W. H. Freeman and Company.
- Nevin, K.P., Woodard, T.L., Franks, A.E., Summers, Z.M., and Lovley, D.R. (2010). Microbial Electrosynthesis: Feeding Microbes Electricity To Convert Carbon Dioxide and Water to Multicarbon Extracellular Organic Compounds. *mBio* *1*.
- Orkuveita Reykjavíkur. 2013. Verkefnisáætlun Sulfix. Um förgun brennsteinsvetnis frá jarðgufuvirkjunum. Sótt apríl 2015 af http://www.or.is/sites/default/files/verkefnisaaetlun_sulfix_2.pdf.
- Pagani, I., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J.-F., Chertkov, O., Davenport, K., Tapia, R., et al. (2011). Complete genome sequence of *Desulfobulbus propionicus* type strain (1pr3T). *Stand. Genomic Sci.* *4*, 100–110.
- Rabaey, K., Girguis, P., and Nielsen, L.K. (2011). Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* *22*, 371–377.
- Rabaey, K., and Rozendal, R.A. (2010). Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 706–716.
- Rabaey, K., Van de Sompel, K., Maignien, L., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P., De Schampelaere, L., Pham, H.T., Vermeulen, J., Verhaege, M., et al. (2006). Microbial fuel cells for sulfide removal. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 5218–5224.
- Sasaki, S., and Karube, I. (1999). The development of microfabricated biocatalytic fuel cells. *Trends Biotechnol.* *17*, 50–52.

Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., and Holtmann, D. (2014). Electroactive bacteria--molecular mechanisms and genetic tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 8481–8495.

Tender, L.M., Reimers, C.E., Stecher, H.A., Holmes, D.E., Bond, D.R., Lowy, D.A., Pilobello, K., Fertig, S.J., and Lovley, D.R. (2002). Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nat. Biotechnol.* *20*, 821–825.

Virginia Tech. Oxidation-Reduction (Redox) Reactions and Potentials. 2003. Sótt mars 2015 af http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-01102003-162857/unrestricted/%2808%29Lit_Rev_2.pdf.

Zhang, T., Bain, T.S., Barlett, M.A., Dar, S.A., Snoeyenbos-West, O.L., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2014). Sulfur oxidation to sulfate coupled with electron transfer to electrodes by *Desulfuromonas* strain TZ1. *Microbiology* *160*, 123–129.

Fylgiskjöl

Vítamínblanda (500x vítamínblanda)

Bíotín	10 mg
Fólic-sýra	10 mg
Pýrídoxín-HCl	50 mg
Þíamín-HCl * 2 H ₂ O	25 mg
Ribóflavín	25 mg
Nicotinic-sýra	25 mg
D-Ca-pantóþenat	25 mg
Vítamín B ₁₂	0,50 mg
p-Amínóbenzóic-sýra	25 mg
Lipoic-sýra	25 mg
Súrefnissnautt milliQ-vatn	1000 mL

Blandan var síuð við dauðhreinsaðar aðstæður yfir í dauðhreinsuð glös sem vafin voru í álpappír. Stærstur hluti var geymdur í kæli en um 50 mL geymdir í kæliskáp.

Steinefnablanda (1000x „Trace Mineral Mix“)

CoCl ₂ * 6 H ₂ O	190 mg
CuCl ₂	2 mg
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	2100 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	100 mg
Na ₂ EDTA (Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O)	5200 mg (5760 mg)
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	36 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	24 mg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	144 mg
Súrefnissnautt milliQ-vatn	Rúmmál að 1 L

Mögulega þarf að hita lausnina til að leysa öll efnin upp. Sýrustig er stillt að pH = 6,4 með 1 M NaOH (vítissóða) áður en lokarúmmál er stillt að 1 L. Lausnin er sett í autoklava.

Selenít-tungsten

NaOH	400 mg
Na ₂ SeO ₃ (eða Na ₂ SeO ₃ * 5 H ₂ O)	3,9 mg (6 mg)
Na ₂ WO ₄ (eða Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O)	8 mg (9 mg)
Súrefnissnautt milliQ-vatn	Rúmmál að 1 L

Lausn svo sett í autoklava.

Ríbóflavín

Mett (e. Concentrated) ediksýra	0,1 mL
Ríbóflavín	2,5 mg
Súrefnissnautt milliQ-vatn	Rúmmál að 100 mL

Fyrst skal þynna ediksýruna út í vatn. Því næst bæta ríbóflavíni út í. Að lokum er vatni bætt við þar til rúmmál lausnarinnar er 100 mL. Lausnin er við dauðhreinsaðar aðstæður síuð í dauðhreinsaða flösku sem vafin er í álpappír og geymd við 4 °C.

B 12

Cyanocobalamín	5 mg
Súrefnissnautt milliQ-vatn	Rúmmál að 100 mL

Lausnin er dauðhreinsuð með síun og geymd í flösku vafðri í álpappír við 4 °C. Þessi lausn var ekki útbúin að þessu sinni þar sem lausn sem innihélt 1,35 g/L af cyanocobalamín var til í frysti.

Þíamín

Þíamín-klóríð-díhýdróklóríð	10 mg
50 mM Na ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ við PH = 3,7	100 mL

Lausnin er dauðhreinsuð með síun og geymd í flösku vafðri í álpappír við 4 °C. Þessi lausn var ekki útbúin að þessu sinni þar sem lausn sem innihélt 5,0 g/L af þíamíni var til í frysti.

Ætíslausn fyrir ræktun *D. propionicus*

Til að byrja með eru eftirfarandi efni sett í 1,8 L af milliQ-vatni. Notast er við 2 L flösku og segli komið fyrir í henni áður en efnunum er bætt út í.

Efni	g/L	MW	g í 1,8 L
NaCl	1,17	58,44	2,11
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,49	95,21	0,89
KCl	0,30	74,55	0,54
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,15	147,01	0,27
NH ₄ * Cl	0,27	53,49	0,58
KH ₂ PO ₄	0,20	154,10	0,37
Na ₂ SO ₄	2,84	142,04	5,11

Þegar öll efni eru komin út í er hrært í lausninni með seglinum. Til að losa súrefni úr lausninni er gasblöndu 5% koldíoxíðs (CO₂) og 95% köfnunarefnis (N₂) eða hreinu köfnunarefni blásið um vökvann í um 2 klst. eða 1 klst/L hið minnsta. Eftir um 2 klst. er flaskan sett í autoklava. Venjulegur tappi er notaður á flöskuna. Í autoklava er bikarglasi með gúmmítappa og plastloki fyrir hann komið fyrir ásamt flöskunni. Glasinu er lokað með álpappír.

Ætinu er leyft að kólna (oftast yfir nótt). Þegar það hefur kólnað er það fært yfir í frumuræktunarskáp og venjulegum tappa skipt út fyrir gúmmítappa. Eftirfarandi blöndum er bætt út í með því að sprauta þeim í gegnum gúmmítappann við dauðhreinsaðar aðstæður í frumuræktunarskáp:

Efni	Magn (mL) í 1,8 L
Ríboflavín	1,8
Þíamín	1,8
B12	1,8
Selenít-tungsten	1,8
500x vítamínblanda	3,6
1000x „Trace Mineral Mix“	1,8
1 M NaHCO ₃	45
Na ₂ S	1,8

Að lokum er sýrustig stillt í kringum pH = 7,3 (7,1-7,5). Til að stilla sýrustig eru notaðar dauðhreinsaðar lausnir af 1 M H₂SO₄ (brennisteinssýru) og 1 M NaOH (vítissóða). Þegar ætið er tilbúið er köfnunarefni sprautað inn í flöskuna til að mynda yfirþrýsting. Þetta kemur í veg fyrir að nokkuð komist inn í flöskuna og auðveldar færslu ætis yfir í serum-flöskur. Notast er við nálar og sprautur til að flytja æti yfir í þær. Þegar æti er fært í serum-flöskur er 1 M Na-

própíonati bætt við svo það samsvari um 1% af lokarúmmáli ætisláusnar og hafi lokastyrk um 10 mM. Til að fá fram aukinn vöxt bakteríunnar má auka hlutfall própíonats í ætinu og til dæmis bæta við 1 M Na-própíonati sem jafngildir 2% af lokarúmmáli ætis. Þetta staðfesti athugun.

Tekið skal fram að þíamín og B12 var bætt út í æti á annan hátt en lýst er að ofan. Þar sem þau vítamín voru til í háum styrk í frysti (B12: 1,35 g/L og þíamín: 5,0 g/L) voru 67 µL af B12-lausn og 36 µL af þíamíni bætt út í lausnina við dauðhreinsaðar aðstæður í frumuræktunarskáp. Gúmmítappi var losaður af og efnin pípettuð yfir í ætið með dauðhreinsuðum oddum áður en tappa var aftur komið fyrir.

Ætisláusn í efnarafal

Til að byrja með eru eftirfarandi efni sett í 1,6 L af milliQ-vatni. Notast er við 2 L flösku og segli komið fyrir í henni áður en efnunum er bætt út í.

Efni	g/L	MW	g í 1,6 L
NH ₄ * Cl	0,25	53,49	0,40
KCl	0,10	74,55	0,16
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,575	137,99	0,92
NaHCO ₃	4,00	84,01	4,00

Þegar öll efnin eru komin út í er hrært í lausninni með seglinum. Til að losa súrefni úr lausninni er gasblöndu 5% koldíoxíðs (CO₂) og 95% köfnunarefnis (N₂) eða hreinu köfnunarefni (N₂) blásið um vökvann í um 2 klst. eða 1 klst/L hið minnsta. Eftir um 2 klst. er flaskan sett í autoklava. Venjulegur tappi er notaður á flöskuna. Í autoklava er bikarglasi með gúmmítappa og plastloki fyrir hann komið fyrir ásamt flöskunni. Glasinu er lokað með álpappír.

Ætinu er leyft að kólna. Þegar það hefur kólnað er það fært yfir í frumuræktunarskáp og venjulegum tappa skipt út fyrir gúmmítappa. Eftirfarandi blöndum er bætt út í með því að sprauta þeim í gegnum gúmmítappann við dauðhreinsaðar aðstæður í frumuræktunarskáp:

Efni	Magn (mL) í 1,6 L
Selenít-tungsten	1,6
500x vítamínblanda	3,2
1000x „Trace Mineral Mix“	1,6
10 g/L CaCl ₂	16

Að lokum er sýrustig stillt í kringum pH = 7,0 með 1 M HCl (saltsýru) eða 1 M NaOH (vítissóða).

