Elektricitetsalstrande bakterier för avfall-till-energi-applikationer

2016-05-17
BBTX01-16-02
Insitutionen för Biologi och Bioteknik
Chalmers tekniska högskola

Handledare:	*E-mailadress:*
Nikolaos Xafenias	xafenias@chalmers.se
Carl-Johan Franzén	franzen@chalmers.se
Författare:	
Tobias Asp	aspt@student.chalmers.se
Robin Bremer	robinbr@student.chalmers.se
Daniel Fjällborg	danfja@student.chalmers.se
Staffan Godman	godman@student.chalmers.se
Emil Sjöholm	emilsj@student.chalmers.se
Marcus Åberg	abergma@student.chalmers.se

Innehållsförteckning

Abstract 1
Sammanfattning 1
1. Bakgrund 2
2. Syfte 3
3. Teori 4
3.1 Bioelektrokemiska system 4
3.1.1 Microbial electrolysis cell 4
3.1.2 Microbial fuel cell 4
3.1.3 Konfiguration av reaktorer 5
3.1.4 H-typ konfiguration 5
3.2 Elektrokemiska tekniker 6
3.2.1 Anodens funktion och vanliga material 7
3.2.2 Katodens funktion och material 7
3.2.3 Membranets funktion 8
3.2.4 Chrono amperogram 8
3.2.5 Cyclic voltammetry 8
3.3 Mekanismer för elektronöverföring mellan bakterie och elektrod 9
3.3.1 Direkt elektronöverföring 9
3.3.2 Indirekt elektronöverföring 10
3.4 Biokatalysatorer 10
3.4.1 *Clostridium acetobutylicum* 10
3.4.2 *Shewanella oneidensis* 10
3.5 Avfall 11
3.5.1 Avfallsvatten från simultan sackarifiering och fermentation 11
3.5.2 Glycerolavfall från biodieselproduktion 11
4. Material och metod 12
4.1 Metod 12
4.1.1 Simultan sackarifiering och fermentation 12
4.1.2 Elektrokemiska metoder 12
4.2 Uppställning av reaktorer 12
4.2.1 Förberedelse av elektroder och membran 14
4.3 Databehandling 15
5. Resultat och diskussion 16
5.1 Framställning av fermentationsavfall 16
5.1.1 Försöksomgång 1: Fermentationsavfall med *C. acetobutylicum* 17
5.2 Glycerolavfall 19

5.2.1 Försöksomgång 2: Glycerolavfall och glukos med *C.acetobutylicum* 19
5.2.2 Försöksomgång 3: Glycerolavfall och LB-medium med *C. acetobutylicum* 20
5.2.3 Försöksomgång 4: Glycerolavfall och LB-medium med *S. oneidensis* 24
5.2.4 Försöksomgång 5: Glycerolavfall och LB-medium med *C. acetobutylicum* och *S. oneidensis* 25
5.2.5 Försöksomgång 6: Glycerolavfall och LB-medium med *C. acetobutylicum* 26
6. Slutsatser 28
7. Källförteckning 29
8. Appendix 31
8.1 Data och grafer/figurer 31
8.1.1 Försöksparametrar och resultat 31
8.1.2 Chrono Amperogram 32
8.1.3 Koncentrationsdata 32
8.1.4 Optiska densiteter 37
8.1.5 Mikroskopi 41
8.2 Laborationsprotokoll 42
8.2.1 Preparation av buffertlösning 42
8.2.2 LB-medium 42
8.2.3 Minimum yeast medium för *S. cerevisiae* 42
8.2.4 Intermediate medium 43
8.2.5 Odling av jäst för SSF 43
8.2.6 Odling av bakteriekultur för BES 43
8.2.7 Provtagning 44
8.2.8 Rengöring och förberedelse av reaktorer 45
8.2.9 Glycerolavfall datablad 45
8.3 Matlab skript 47
8.4 Felkällor 51

Abstract

Electricity generating bacteria for conversion of waste to energy applications

The production of biofuels is increasing annually as a part of the transition from fossil fuels to renewable energy. Waste from these processes is also increasing as a direct result. The waste contains large amounts of untapped energy, chemically bound in organic molecules. By using microorganisms as biological catalysts the energy might be converted into electrical power, fuels or commodity chemicals. Microbial metabolism can be utilized to catalyze redox reactions during electrolysis in bioelectrochemical system (BES), such as microbial electrolysis cells (MEC) and microbial fuel cells (MFC). This report investigates the possibilities of using waste water from fermentation and glycerol waste from biodiesel production with mixed and pure cultures of *Clostridium acetobutylicum* and S*hewanella oneidensis* in MEC. *C. acetobutylicum* was shown to produce lactate from glycerol waste in the presence of glucose. No biocatalysis for wastewater from fermentation was observed. *S. oneidensis* seemed to consume lactate in anodic conditions. A mixed culture was also shown to be beneficial for current generation implying that an interspecies metabolic exchange occurred. This, combined with the observed production of lactate, provide interesting topics for future investigations. Further research to improve biocatalysis of glycerol waste is needed in order to develop large-scale industrial applications. This would strengthen the sustainability of the biodiesel production process, and in turn, the economic and environmental incentive to move towards a bio-based economy.

Sammanfattning

Produktion av biobränslen ökar årligen som ett led i omställningen från fossila till förnyelsebara bränslen. En direkt följd är att mängden avfall från dessa processer ökar. I avfallet finns stora mängder outnyttjad energi bundet i organiska molekyler. Genom att använda mikroorganismer som biologiska katalysatorer skulle avfallet kunna konverteras till elkraft, bränslen eller andra mer värdefulla kemikalier. Via sin metabolism kan mikroorganismerna katalysera redoxreaktioner vid elektrolys i bioelektrokemiska system (BES) som exempelvis microbial electrolysis cells (MEC) och microbial fuel cells (MFC). Projektet undersökte möjligheterna att använda MEC med avfallsvatten från fermentation och glycerolavfall från biodieselproduktion med blandade och rena kulturer av *Clostridium acetobutylicum* och *Shewanella oneidensis*. *C. acetobutylicum* visade sig kunna producera laktat i närvaro av glycerolavfall och glukos. *S. oneidensis* tycktes kunna konsumera laktat under anodiska förhållanden. Ingen biokatalys kunde konstateras för avfallsvatten från fermentation. Under anodiska förhållanden visade sig blandkultur vara fördelaktigt för strömproduktion från glycerolavfall vilket indikerar ett metaboliskt utbyte mellan arterna. Detta kombinerat med den observerade laktatproduktionen utgör ett intressant underlag för framtida forskning. Ytterligare studier i syfte att förbättra biokatalys av glycerolavfall krävs för att utveckla industriella applikationer i större skala. En effektiv återanvändning av avfallet skulle stärka hållbarheten för produktionsprocessen och i förlängningen medföra starkare ekonomiska och miljöbetingade incitament för en biobaserad ekonomi.

1. Bakgrund

I vad som vanligtvis betraktas som avfall finns ansenliga mängder outnyttjad energi, bunden i organiska molekyler. Metoder för att ta tillvara på denna tillgång utnyttjas redan, till exempel i form av rötningsanläggningar som producerar metangas från hushållsavfall, men potentialen för utökning är stor.

Genom att utnyttja mikroorganismers metabolism kan organiskt avfall konverteras till elkraft, bränslen eller andra mer värdefulla kemikalier. Detta möjliggörs genom att använda bakterier som katalysatorer för redoxreaktioner i så kallade bioelektrokemiska system (BES) vilket är ett samlingsnamn för en rad olika system. Ett av dessa är microbial electrolysis cell (MEC) i vilken mikroorganismer odlas vid en elektrod med applicerad spänning.

De senaste åren har flera stora anläggningar för produktion av bioetanol från lignocellulosa startats upp. Kapaciteten för var och en av dessa uppgår till mellan 5 och 82 miljoner liter etanol årligen (1–3). Avfallsvattnet från dessa och kommande anläggningar innehåller dels ämnen som inte bryts ned av den jäst som används, dels oönskade biprodukter från fermentationen. Genom att utnyttja mikroorganismer i BES kan avfallsvattnet i teorin utnyttjas för att generera mervärdesprodukter. Bioraffinaderier av denna typ är viktiga för omställningen från fossila till hållbara bränslen och är således föremål för intensiv forskning i syfte att effektivisera produktionsprocesserna och sänka kostnaderna.

Ett led i denna omställning är att använda biodiesel, ett förnybart bränsle, för att möta den stigande efterfrågan av petroleumprodukter. Biodiesel utvinns från vegetabiliska oljor eller animaliskt fett genom transesterifiering av triglycerider med hjälp av en katalysator och alkohol, eller genom hydrolys, vilket ger upphov till cirka 10 massprocent glycerol som biprodukt (4). En global ökning av biodieselproduktion, en fördubbling mellan 2002-2011, har lett till ett stort överskott av glycerolavfall vilket inte är förenligt med en hållbar process då rening av detta avfall är kostsamt (4). Om denna biprodukt kunde användas som substrat för mikroorganismer i BES skulle överskottet motverkas samtidigt som kostnaderna för uppreningen reducerades. Andra kemikalier skulle dessutom kunna produceras och användas inom andra tillämpningsområden. Sammantaget etablerar detta betydande incitament för vidare utveckling av biodieselproduktion.

Ytterligare ett viktigt appliceringsområde för BES är energieffektivisering av reningsverk med hjälp av microbial fuel cells (MFC). Energibehovet för rening av avfallsvatten uppgår till cirka 0.5 kWh/m^3 för de flesta västerländska länderna, vilket motsvarar cirka 2-3% av den nationella energikonsumtionen (5,6). Studier har visat att detta avfallsvatten i teorin istället skulle kunna generera cirka 2 kWh/m^3 med hjälp av mikroorganismer (5,7). Dessa exempel är starka anledningar till att ytterligare utveckla denna teknik ur både ett hållbarhets- och ekonomiskt perspektiv.

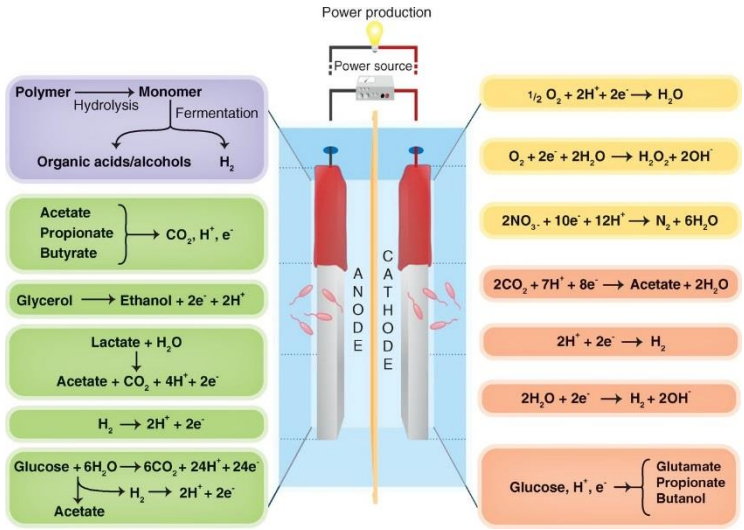
2. Syfte

Projektets mål är att undersöka möjligheterna samt hur effektivt det är att utnyttja mikroorganismer som biologiska katalysatorer i bioelektrokemiska system för att omvandla två typer av organiskt material, glycerolavfall som biprodukt från biodieselproduktion och avfallsvatten från jäsning av lignocellulosa, till elkraft och användbara kemikalier.

3. Teori

3.1 Bioelektrokemiska system

Bioelektrokemiska system är ett samlingsnamn för metoder som använder bakterier och mikroorganismer i galvaniska celler för att utvinna energi eller kemikalier genom nedbrytning av organiska ämnen (figur 1). De används för att rena och förädla avfallsprodukter. De två primära konfigurationerna är MEC, vilken går ut på att producera kemikalier vid nedbrytning av organiska ämnen, och MFC som används för att generera elektrisk energi.



Figur 1. Översikt av anodiska och katodiska reaktioner i ett BES. En kraftkälla eller en resistor kopplas till elektroderna för att skapa en MEC respektive en MFC. Återges med tillåtelse från Science (8).

3.1.1 Microbial electrolysis cell

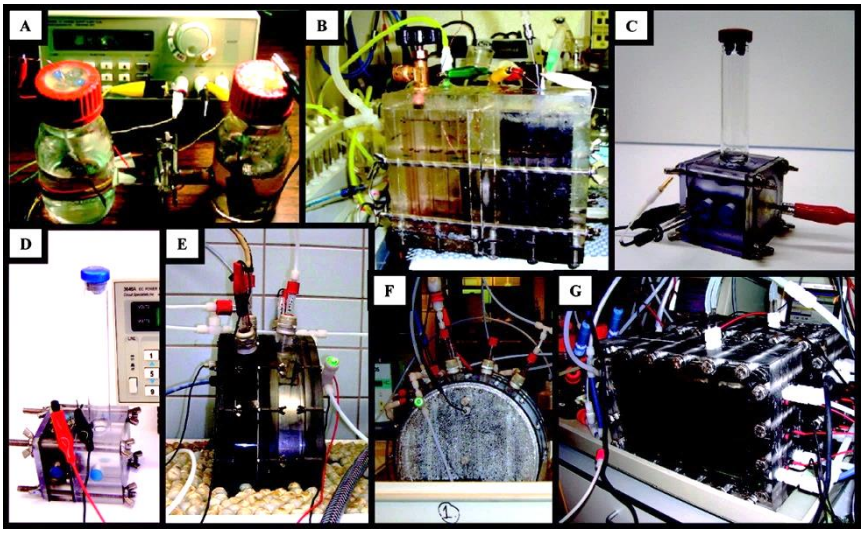
MEC är ett bioelektrokemiskt system som primärt används för att producera vätgas genom elektrolys katalyserad av mikroorganismer. Den är antingen uppbyggd av två elektrodförsedda och vätskefyllda kammare separerade med ett membran, alternativt en kammare helt utan avskiljning. Genom att kontrollera potentialskillnaden mellan elektrod och lösning med en potentiostat skapas en stabil miljö för mikroorganismerna där elektronöverföringen kan kontrolleras. En referenselektrod placeras i den kammare som studeras för att kontrollera spänningen (9). Vid anod och katod sker oxidation respektive reduktion. Olika mikroorganismer kan genom sin metabolism fungera antingen som elektrondonatorer eller elektronacceptorer.

3.1.2 Microbial fuel cell

I en MFC konsumerar mikroorganismer organiska föreningar vilket skapar elektrisk ström utan att en potential appliceras. Systemet är uppdelat i två kamrar, ofta avskilda med ett membran. Elektroder sänks ner i varje kammare och sammankopplas via en ledare med resistor vilket ger en anod- och katodsida. Bakterier odlas i en eller båda kammare i närvaro av substrat. När bakterier oxiderar de organiska föreningarna genom sin metabolism samlas elektronerna upp av anoden och färdas genom kretsen till katoden där de överförs till en elektronacceptor. Motsatt förlopp gäller vid reduktion. Genom att koppla en resistor till kretsen uppstår en spänning (10).

3.1.3 Konfiguration av reaktorer

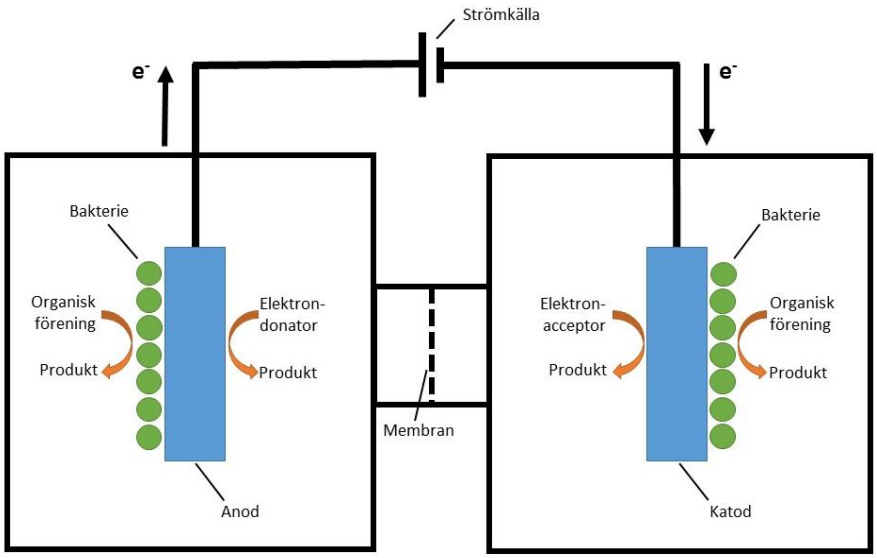
Det går att designa reaktorn på en rad olika sätt (figur 2). Man kan låta reaktorerna köras satsvis, kontinuerligt, eller som fed-batch. Det går även att variera reaktorernas form. En variant är membranavskilda rätblocksformade kamrar staplade på varandra (9). I en sådan konstruktion kan elektroderna vara närmare varandra och ett större membran kan utnyttjas vilket leder till en mindre inre resistans. Ett annat exempel är en kontinuerlig reaktor där gasflöden går genom hela reaktorn via böjda tuber (9). Den typen av design minskar antalet stagnanta områden i reaktorvätskan, vilket leder till att lokala pH-variationer inte är lika stora. Dessa variationer kan annars inhibera elektronöverföringen. Om vätgas produceras skulle det även kunna samlas upp mer effektivt utan att det fastnar i gaskanalerna.



Figur 2. Samling av olika konfigurationer av BES. A) H-typ reaktor med två flaskor. B) och D) Två kub-typ reaktorer med ett membran som separerar anod och katod. C) Kub-typ reaktor utan membran som separerar elektroderna. E) Diskformad reaktor med två kamrar som separeras med ett membran. F) Diskformad reaktor med membran samt en gasdiffusionselektrod. G) Rektangulär reaktorkonfiguration med böjda tuber som går genom reaktorn. Återges med tillåtelse från Environmental Science & Technology (11).

3.1.4 H-typ konfiguration

En H-typ reaktor är en konstruktion med två glasflaskor sammankopplade med en glastunnel, ofta avskilda av ett membran (figur 3). I glasflaskorna sitter varsin elektrod som är inkopplad till en strömkälla, exempelvis en potentiostat, som kan sätta en fast potentialskillnad mellan elektrod och lösning med hjälp av en referenselektrod. Slangar kan kopplas till reaktorn varigenom gas kan flöda in och ut för att förse bakterierna med näring, ta bort oönskade gaser eller leda ut produkter. En nackdel med H-typ konfigurationen är den interna resistansen som uppstår på grund av det stora avståndet mellan elektroderna samt membranets lilla yta (9).



Figur 3. Schematisk bild beskrivande en H-typ konfiguration av ett BES. Bakterier kan odlas i ena eller båda kamrarna där de katalyserar redoxreaktioner. Mellan kamrarna sitter ett membran. Vid MEC används en potentiostat för att sätta en potentialskillnad mellan elektrod och vätska. Vid MFC används en resistor för att skapa elektricitet.

3.2 Elektrokemiska tekniker

Vid beräkning av olika elektrokemiska reaktioner och processer är det viktigt att kunna beräkna ström och spänning för att kunna analysera och förstå resultatens innebörd. Till detta används bland annat Nernst ekvation (9). Följande standardiserade reaktion vid anod- och katodsida antas gälla:

$$\text{Anod: } aA \rightarrow bB + cH_3O^+ + ne^- \quad [1]$$

$$\text{Katod: } dD + ne^- + hH_3O^+ \rightarrow jJ \quad [2]$$

För att en reaktion ska ske spontant krävs att förändringen i Gibbs fria energi $\Delta(G_r)$, är negativ för reaktionen. Om så inte är fallet måste extra energi adderas till systemet för att överkomma detta termodynamiska hinder. Vid användning av MEC kommer denna energi från applicerad potentialskillnad. Reaktion i en MEC sker endast om den tillsatta spänningen är större än jämviktsspänningen E_{eq} (9), som är proportionell mot $\Delta(G_r)$ enligt följande samband (10):

$$E_{eq} = -\frac{\Delta(G_r)}{n \cdot F} \quad [3]$$

där F = 96 485 C/mol e^- avser Faradays konstant och n är antalet mol involverade elektroner i reaktionen. E_{eq} kan ses som skillnaden mellan den teoretiska potentialen vid katoden, E_{cat}, och anoden, E_{an} (9).

$$E_{eq} = E_{cat} - E_{an} \quad [4]$$

Nernst ekvation, [5] och [6], kan användas för att beräkna de teoretiska potentialerna utifrån tabellerade standardvärden, E^0_{an} samt E^0_{cat} (9), vilka gäller när reaktanternas koncentrationer är 1 M. Sambanden mellan dessa och de verkliga värdena är följande (11):

$$E_{an} = E^0_{an} - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln\left(\frac{[reduktionsmedel]^a}{[oxiderat\ ämne]^b \cdot [H_3O^+]^c}\right) = E^0_{an} - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln\left(\frac{[A]^a}{[B]^b \cdot [H_3O^+]^c}\right) \quad [5]$$

$$E_{cat} = E^0_{cat} - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln\left(\frac{[reducerat\ ämne]^j}{[oxidationsmedel]^d \cdot [H_3O^+]^h}\right) = E^0_{cat} - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln\left(\frac{[J]^j}{[D]^d \cdot [H_3O^+]^h}\right) \quad [6]$$

där T är den absoluta temperaturen i kelvin och R=8,314 J/K mol är den allmänna ideala gaskonstanten. Ekvation [5] och [6] är Nernst ekvation för anod respektive katod (9).

I systemet kommer den applicerade potentialen E_{ap} alltid vara högre än E_{eq} (9). Detta på grund av systemets inre förluster i form av ohmförluster, IR_Ω, samt anodisk- och katodisk överpotential, φ_a respektive φ_c [7]. De senare inkluderar även bakteriens metaboliska förluster. IR_Ω är beroende av systemets ohmiska resistans $R_\Omega[\Omega]$ och den genererade strömmen I i ampere (10).

$$E_{ap} = E_{eq} - (\sum \varphi_a + |\sum \varphi_c| + IR_\Omega) \quad [7]$$

Dessa förluster kan ses i rådatan då de uppmätta potentialerna inte riktigt motsvarar det inmatade värdet.

3.2.1 Anodens funktion och vanliga material

Anoden tar upp de elektroner som frigörs av oxidationsreaktionerna och transporterar dem vidare till katoden. Om anodsidan inte är inokulerad tas elektroner från en oxidationsreaktion som orsakas av enbart potentialskillnaden mellan elektroderna. Potentialskillnaden är proportionell mot Gibbs fria energi [3] och är beroende av den standardiserade potentialen E^0, satt mot standard väteelektrod (SHE), tagen från tabell vid 25 °C och 101325 Pa (11). Potentialskillnaden beräknas således från E^0 med [5] och [4] för oorganiska fall såsom oxidation av vatten (11):

$$6H_2O \rightarrow 4H_3O^+ + O_2 + 4e^- \qquad E^0 = -1{,}229\ V \text{ mot SHE.} \quad [8]$$

samt organiskt fall såsom oxidation av acetat (10):

$$CH_3COO^- + 13H_2O \rightarrow 2\,HCO_3^- + 9H_3O^+ + 8e^- \quad E^0 = -0{,}187\ V \text{ mot SHE.} \quad [9]$$

Om potentialen inte anges vid standardbetingelser så specificeras den E'. För [9] gäller att $E' = 0{,}296\ V$ vid koncentrationerna $HCO_3^- = 5mM$ samt $CH_3COO^- = 5mM$ och ett pH-värde 7 (10).

Vanliga elektrodmaterial är olika typer av kol såsom grafit, kolpapper eller kolfilt. För att öka prestandan kan dessa förbehandlas i en gasprocess med ammoniak vid hög temperatur vilket leder till högre strömtätheter. Detta beror på att mikroorganismens adhesion på den positivt laddade ytan ökar samt att elektronöverföringen blir mer effektiv (9). Det går även att använda porösa elektroder. En större yta blir då tillgänglig för elektronöverföring vilket leder till en större ström mellan elektroderna då fler elektroner kan överföras per ytenhet. Om referenselektroden är placerad på anodsidan och potentialen ansätts där, kallas den arbetande anod.

3.2.2 Katodens funktion och material

Till katoden kommer elektroner från anoden för att sedan gå ut i lösning och involveras i reduktionsreaktioner. Är katodsidan inokulerad tenderar elektroderna utnyttjas i mikroorganismernas metabolism. Om katodsidan inte är inokulerad så kommer elektronerna reagera enligt följande reduktionsreaktioner (11):

$$O_2 + 4H_3O^+ + 4e^- \rightarrow 6H_2O \qquad E^0 = 1{,}229\ V \text{ mot SHE.} \quad [10]$$

$$2H_3O^+ + 2e^- \rightarrow H_2 + 2H_2O \qquad E^0 = 0{,}00\ V \text{ mot SHE.} \quad [11]$$

där standardpotentialerna (11) kan utnyttjas tillsammans med [6] och [4] för att beräkna potentialskillnaden. Denna är då proportionell mot Gibbs fria energi enligt [3]. Reaktion [10] inträffar endast vid närvaro av syre. Följande är ett organiskt exempel på en reduktionsreaktion i en levande cell vid potential E' angiven vid pH 7 mot SHE (5):

$$NAD^+ + H_3O^+ + 2e^- \rightarrow NADH + H_2O \quad E' = -0.32\ \text{V mot SHE.} \quad [12]$$

Katoden kan vara av samma typ av material som anoden. Väteproduktionen hos MEC sker vid katoden, denna är dock långsam vid kolelektroder vilket betyder att en väldigt stor överpotential krävs för att

driva reaktionen. I stället för kol kan platina användas för att minska denna överpotential, men det finns en del nackdelar. Dessa är främst hög kostnad men även de negativa miljöeffekterna vid extrahering av platina. Platinakatoder kan också bli förstörda av sulfider, vilka är vanligt förekommande i avloppsvatten (9). Om referenselektroden är placerad på katodsidan och potentialen ansätts där, kallas den arbetande katod.

3.2.3 Membranets funktion

Membranet används för att separera de två kamrarna så att elektronöverföringen ska kunna ske via elektroderna. Protonutväxlingsmembran är en typ av membran som endast tillåter att protoner tar sig igenom det (9). En annan typ är katjonutbytesmembran, vilket tillåter andra katjoner än protoner att ta sig igenom. Om koncentrationen av dessa katjoner är tillräckligt hög blockerar de tillförseln av de nya protoner som genereras vid anoden (9). Detta kan bli problematiskt eftersom att avfallsvatten ofta har relativt höga koncentrationer av Na^+, K^+, NH_4^+, och Ca^{2+}.

3.2.4 Chrono amperogram

Chrono amperogram (CA) används för att visualisera systemets elektrokemiska aktivitet över tid. Potentiostaten håller potentialen hos arbetande elektrod konstant. Strömmen som uppstår till följd av redoxreaktioner erhålls som funktion av tid (12). Den totala laddningen *Q* [C] som genereras, alternativt konsumeras, efter tiden *t*[s] beräknas enligt (10,13):

$$Q = I \cdot t = F \cdot n \quad [13]$$

Ström som bildas i katoden kommer ha ett negativt tecken i jämförelse med den positiva anodströmmen. Detta då anoden avger och katoden tar upp elektroner. Om ström bildas vid CA-experiment för en biotisk reaktor men inte i abiotisk kontroll är det en indikation på biokatalytisk aktivitet.

3.2.5 Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry (CV) används för att utvinna termodynamisk samt kvalitativ information om mekanismen bakom elektronöverföringsprocessen genom att undersöka strömgeneration under varierande spänning. Efter genomfört CV-experiment erhålls en graf med ström som funktion av spänning. Slutsatser kan dras gällande biokatalys, reversibilitet av redoxmediatorer och deras beroende av spänningens variationshastighet, vilka redoxreaktioner som ansvarar för strömproduktionen, masstransportens inflytande, skillnaden mellan diffusiva och absorberande egenskaper hos redoxmediatorerna samt deras formella potential. Experimentet inleds vid en startpotential E_1, fortsätter till en slutpotential E_2 och går sedan tillbaka igen för att sluta cykeln. Spänningen varierar med avsökningshastighet *v* (14):

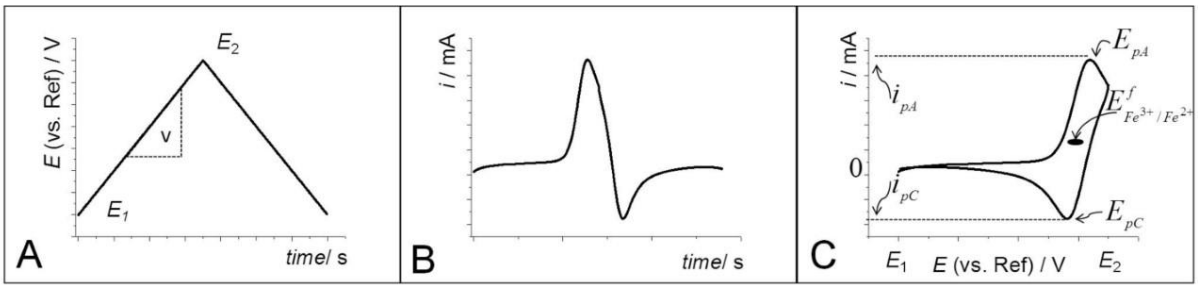
$$\nu = \frac{\delta E}{\delta t} \quad [14]$$

Exemplet i figur 4 gäller för följande readoxreaktion (15):

$$Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+} + e^- \quad [15]$$

Spänningen ändras över tid (figur 4A) där avsökningshastigheten utläses som kurvans gradient. Denna kombineras med producerad ström mot tid (figur 4B) för att erhålla ström plottad mot spänning (figur 4C). I början av cykeln registreras endast försumbar bakgrundsström. Vid en viss potential börjar Fe^{2+} oxidera och ger då en ström som går mot ett positivt anodiskt toppvärde I_{pA}, vid den anodiska toppotentialen E_{pA}. När spänningen passerat detta värde sjunker strömmen i takt med att Fe^{2+} förbrukas [15]. När spänningen nått E_2 och vandrar tillbaka mot E_1 reduceras Fe^{3+}i ett omvänt förlopp vilket

registreras som en negativ katodisk ström med toppvärde I_{pC} för motsvarande katodisk toppotential E_{pC} (16).



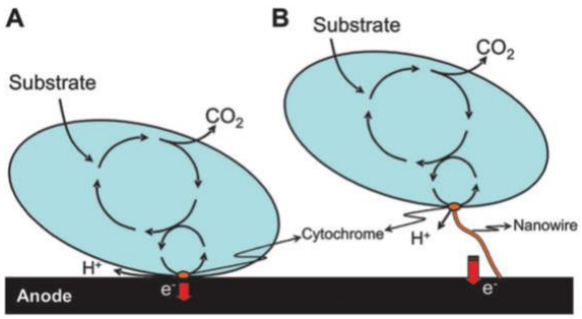
Figur 4. Oxidation och återreduktion av Fe(+II). A) Applicerad potential mot tid. B) Ström mot tid. C) Ström mot potential i en CV-kurva. Återges med tillåtelse från Dr. Falk Harnisch (Helmholtz-Centre for Environmental Research/ Tyskland) och adapterad från (17).

För detta projekt är det viktigt att kunna utröna huruvida en redoxreaktion är associerad med biokatalys. Då redoxmediatorerna återreduceras respektive återoxideras kontinueligt av mikrooganismerna vid anod respektive katod blir kurvan s-formad. Den s-formade kurvan står i kontrast till enskilda toppar vilka inte nödvändigtvis påvisar biokatalytisk effekt (17).

3.3 Mekanismer för elektronöverföring mellan bakterie och elektrod

3.3.1 Direkt elektronöverföring

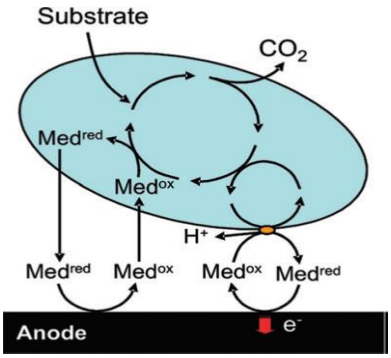
Bakterier kan växa på ytan av en elektrod och bilda biofilmer, elektronöverföringen sker då via direkt fysisk kontakt mellan bakterie och elektrod (figur 5), (12,18). Denna typ av elektronöverföring kräver att bakterien har membranbundna elektrontransportproteiner som exempelvis c-typ cytokromer och multi-heme proteiner. Dessa proteiner förflyttar elektronerna från bakteriens insida till dess utsida. Det slutgiltiga transportproteinet är ett redoxprotein som i kontakt med en extern elektrondonator eller elektronacceptor kan acceptera respektive donera elektroner och därmed tillåta elektronöverföring. Denna typ av direkt elektronöverföring kräver full kontakt mellan bakterie och elektrod. Detta betyder att endast bakterier i biofilmen som har direkt kontakt med elektroden är elektrokemiskt aktiva. Vissa bakteriearter kan undvika detta problem genom ledande pili, så kallade ”nanowires” eller nanotrådar (12). Nanotrådarna sitter ihop med membranbundna cytokromer där elektronöverföringen till och från cellens insida sker. Eftersom nanotrådarna gör att bakterien inte behöver befinna sig direkt på elektroden så leder detta till en större elektronöverföring då fler bakterier kan vara elektrokemiskt aktiva samt att tjockare biofilmer kan bildas. Detta i sin tur leder till en ökad prestanda hos elektroderna.



Figur 5. Direkt elektronöverföring mellan respirerande bakterier och anod. A) Direkt elektronöverföring vid kontakt med anod. B) Direkt elektronöverföring via nanotråd. Återges med tillåtelse från Physical Chemistry Chemical Physics (12).

3.3.2 Indirekt elektronöverföring

Bakterier kan leva och växa fritt i vätskefas utan kontakt med elektroden (figur 6). För att elektronöverföring ska kunna ske krävs då en mediator som kan transportera elektronerna mellan bakterie och elektrod (12). Dessa mediatorer kan vara exogena artificiella redoxmediatorer som exempelvis neutralröd, metylenblått, eller riboflavin. De kan även vara primära eller sekundära metaboliter som produceras i bakteriens egen metabolism (12). Detta är fördelaktigt i fall där bakterierna bildar tjocka biofilmer och exogena redoxmediatorer då får svårt att nå bakterier längre in i biofilmen. Det är främst fermentation samt anaerob respiration som producerar dessa metaboliter.



Figur 6. Indirekt elektronöverföring vid respirerande bakterie växande på en anod med endogen respektive exogen redoxmediator. Återges med tillåtelse från Physical Chemistry Chemical Physics (12).

3.4 Biokatalysatorer

3.4.1 *Clostridium acetobutylicum*

C. acetobutylicum är en obligat anaerob, gram-positiv, stavformad bakterie (16). Bakterien har historiskt använts för att producera aceton, butanol, etanol, isopropanol och organiska syror vid fermentation av olika kolkällor. Två sådana kolkällor är glukos och glycerol, men även vissa pentoser som xylos (19,20). I en vanlig kemostatodling kan *C. acetobutylicum* inte växa på enbart glycerol, utan kräver tillsats av glukos (21). Vid odling i satsvisa reaktorer så uppvisas en tvåfasig metabolism (22). I den första acidogena tillväxtfasen produceras höga koncentrationer av butyrat och acetat. *C. acetobutylicum* går sedan in i den andra, solventogena, tillväxtfasen efter ackumulation av fermentationsprodukter vilket leder till att pH sjunker. I denna tillväxtfas så konverteras butyrat och acetat till butanol respektive aceton. Vid för stor pH-sänkning kan bakterien gå in i en sporuleringsfas, vilket gör att fortsatta reaktioner stoppas. De främsta produkterna som bildas vid kontinuerlig odling av *C. acetobutylicum* på glukos och glycerol är laktat, vätgas, etanol, acetat, aceton, butanol och butyrat. Butanol kan även produceras vid närvaro av xylos (20). *C. acetobutylicum* kan använda indirekt elektronöverföring mellan bakterie och elektrod via exogena redoxmediatorer som exempelvis metylviologen eller neutralröd (18). Tidigare studier har visat att *C. acetobutylicum* är elektrokemiskt aktiv i BES. Den är kapabel att producera ström (23), och bilda en rad ämnen vilka inkluderar butanol, aceton, och vätgas (22).

3.4.2 *Shewanella oneidensis*

S. oneidensis är en gram-negativ, stavformad, fakultativt aerob bakterie (24). Den använder syre som elektronacceptor under aerob respiration, men under anaeroba förhållanden kan andra elektronacceptorer utnyttjas, exempelvis oxiderade metaller eller en anod. *S. oneidensis* kan använda sig av flera olika kolkällor som exempelvis laktat, acetat, och pyruvat (25). Då den växer på laktat är acetat den främsta produkten som bildas. Eftersom den även kan växa på acetat så kommer en del av det producerade acetatet att konsumeras tillsammans med laktatet så länge tillväxt sker. Då *S. oneidensis* är fakultativt aerob kan tillväxt ske anaerobt, men då långsammare än under aeroba förhållanden (26). Den kan använda sig av direkt elektronöverföring genom att bilda en biofilm på elektroden samt genom att

skapa nanotrådar (18,23). Förutom direkt elektronöverföring kan *S. oneidensis* även använda sig av indirekt elektronöverföring via utsöndring av redoxmediatorer (23). Dessa redoxmediatorer är flaviner som fungerar som små elektronskyttlar som kan transportera elektroner mellan cellen och elektroden. Under odling i BES har ström- samt vätgasproduktion observerats med L-laktat som främsta elektrondonator (27).

3.5 Avfall

3.5.1 Avfallsvatten från simultan sackarifiering och fermentation

Simultan sackarifiering och fermentation (SSF) är en metod för att bryta ned olika sorters cellulosa till diverse sockerarter och genom enzymatisk hydolysering med fermentation i samma kärl, syntetisera etanol (14). Detta genom att tillsätta enzymer som bryter ned cellulosa och jäst som fermenterar sockret till alkohol. Fördelar med denna process är att endast ett kärl behövs, vilket drar ned på kostnaderna och mängden utrustning som behövs. Dessutom har det visat sig att en viss mängd etanol i mediet gör att blandningen blir mindre känslig för mikrobiell kontamination (15). En eventuell bortkokningsprocess för att ta bort alkoholer kan frigöra ytterligare glukos eller övriga metaboliter såsom pyruvat, vilka skulle kunna nyttjas i BES.

3.5.2 Glycerolavfall från biodieselproduktion

Vid produktion av biodiesel bildas glycerol som biprodukt via transesterifiering av triglycerider från animaliskt eller vegetabiliskt fett (4). Denna alkohol är ett fungerande näringsämne för vissa bakterier, bland andra *C. acetobutylicum* som tidigare påvisats kunna bilda laktat från detta substrat. Ett typiskt glycerolavfall innehåller även många andra produkter såsom diverse oxider och vatten (appendix 8.2.9).

4. Material och metod

4.1 Metod

4.1.1 Simultan sackarifiering och fermentation

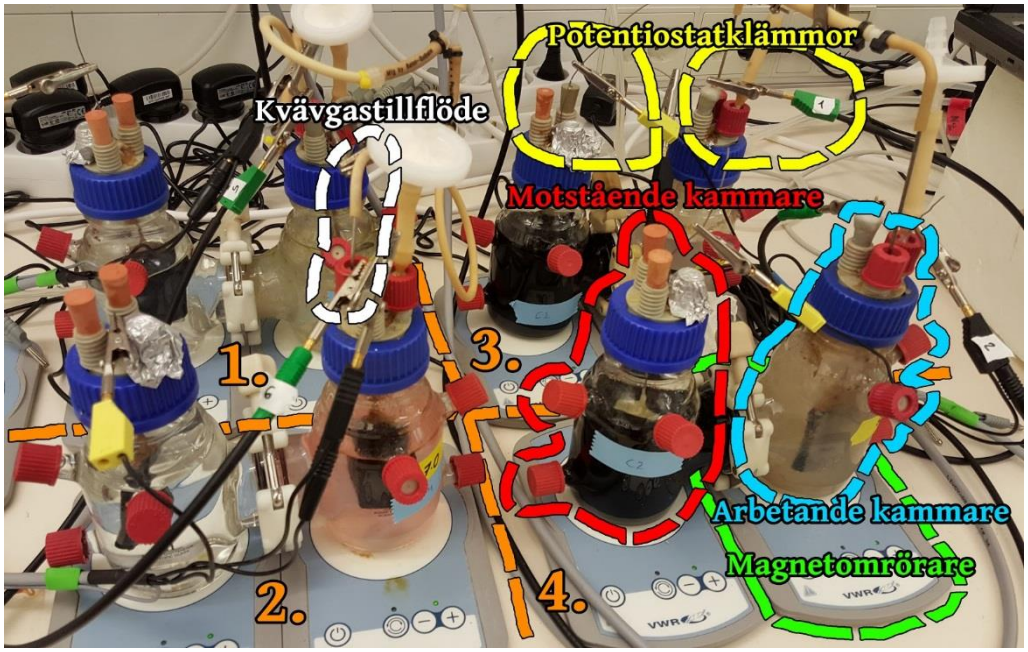
Det laborativa arbetet inleddes med SSF av lignocellulosa. Halm ångförbehandlades vid SP Biorefinery Demo Plant, Örnsköldsvik, och tillhandahölls av Ruifei Wang. Materialet erhölls separerat i flytande och fast fas. 125 g solid fas blandades med lika del flytande fas till 20 % (w/w) WIS. Jäst odlades upp på minimum yeast medium i 17 h (appendix 8.2.3). Jästtillväxten följdes med OD_{600} för att avgöra mängden celler. När OD_{600} var mellan 2,54 och 3,76 (appendix 8.2.5) blandades 8 ml av förkulturen med 0,25 g diammoniumfosfat samt 2,3 ml enzymblandning Cellic Ctek2 (Novozymes) med 5 FPU/g WIS till halmstrået. Blandningen späddes till 500 ml med vatten för att erhålla 10 % (w/w) WIS. Fermentationen skedde i E-kolvar med bomullspropp på skakbord med 180 rpm vid 30°C. Prov togs 2 gånger om dagen och analyserades med high performace liquid chromatography (HPLC). Då odlingskärlen inte innehöll någon buffert tillsattes små mängder natriumhydroxid för att hålla pH mellan 5 och 5,5. SSF avslutades efter cirka 55 h. Etanolen som producerats under fermentationen kokades bort för att erhålla avfallsvattnet.

4.1.2 Elektrokemiska metoder

Den producerade strömmen vid CA-experiment mättes en gång per minut som tidigare beskrivet enligt (28). För varje försöksomgång genomfördes CV med 1 mV/s avsökningshastighet på samma sätt som (28). Detta utfördes i tre cykler där endast den tredje redovisas. De två första genomförs för att uttömma icke redoxrelaterad ström (29). Då skillnaden mellan andra och tredje cykeln var liten ansågs inte fler vara nödvändiga.

4.2 Uppställning av reaktorer

I samtliga experiment användes bioreaktorer (figur 7) med två kamrar separerade av ett protonmembran (CMI-7000, Membranes International Inc, USA). Varje kammare fylldes till en total volym på 280 ml av olika lösningar för olika försök. Lösningen i samtliga reaktorer var ständigt under omrörning och innehöll en grafitelektrod med en total area på cirka 40 cm^2 (4.2.1). Elektroderna kopplades till en potentiostat (MLAB; Bank Elektronik-Intelligent GmbH) som med hjälp av en Ag/AgCl-referenselektrod, kontrollerade spänningen mellan elektrod och lösning. Notera att detta ger andra standardpotentialer jämfört med standard väteelektrod (3.2). Potentialen hölls under uppsikt då för hög potential kunde förstöra elektroderna.



Figur 7. Uppställningen av reaktorerna. 1. Reaktor med arbetande anod. 2. Referensanod. 3. Arbetande katod. 4. Referenskatod.

Inför varje försöksomgång förbereddes fyra reaktorer (appendix 8.2.8). Experimenten undersökte bakteriernas förmåga att reducera respektive oxidera organiskt material i arbetande kammare. I reaktor med arbetande katod applicerades först -800 mV då lägre potential kan ge vätgasproduktion [11]. Eftersom ingen betydande elproduktion observerades sänktes potentialen trots detta till -1300 mV redan under första försöksomgången. I reaktor med arbetande anod sattes elektrodens potential till noll i samtliga experiment efter handledares rekommendation. Till varje försök fanns alltid två referensreaktorer med identiska förhållanden men utan bakterier. Reaktorerna kopplades till en dator som registrerade uppmätt ström och applicerad potential en gång i minuten (Software: MLab Sci 482f, Bank Elektronik-Intelligent Controls GmbH, Germany).

Reaktorerna hade ett konstant inflöde av kvävgas för att bibehålla anaeroba förhållanden och allt arbete utfördes sterilt för att undvika kontamination. Provtagning skedde regelbundet (appendix 8.2.7), då utfördes mätning av OD_{600} med spektrofotometer, Genesys 20, Thermo Scientific, USA. Analys av innehållet gjordes även med HPLC, Dionex® Ultimate 3000, Dionex Corp., USA. De HPLC-kolumner som användes var Rezex™ ROA-Organic Acids H+ column (8%; 300 mm × 7.8 mm), Phenomenex Inc., Danmark.

Vid provtagningen justerades även pH-värdet. Till justeringen användes filtrerad NaOH och filtrerad HCl med varierande koncentrationer. pH-värdet sattes initialt till 7 vid de olika försöken (förutom anodreaktorn i försöksomgång ett då den sattes till 5,5) då det är gynnsamt för *C. acetobutylicum* (30–33). De två bakteriestammarna som användes i de olika försöksomgångarna var *C. acetobutylicum* (ATCC 824) och *S. oneidensis* MR-1 (ATCC 700550).

Bakterier förodlades inför första försöket (appendix 8.2.6) i respektive uppstartsmedium, även kallat LB-medium (appendix 8.2.2). I samtliga försök inokulerades reaktorerna med 2 ml bakterierkultur ur detta LB-medium och i referensreaktorerna tillsattes även 2 ml LB-medium utan bakterier.

I ett par av försöken användes buffertlösning bestående av NH_4CL, $MgSO_4$, K_2HPA_4, KH_2PO_4, biotin, p-bensoesyra, $FeSO_4$ och MQ-vatten (appendix 8.2.1). Från och med försöksomgång 2 tillsattes även redoxmediatorerna neutralröd och riboflavin för att öka strömproduktionen i samtliga reaktorer. Dessa valdes för att de har en redoxpotential som är fördelaktig vid försöken och inte var giftiga för bakterien. Övriga skillnader mellan varje reaktoromgång (tabell 1).

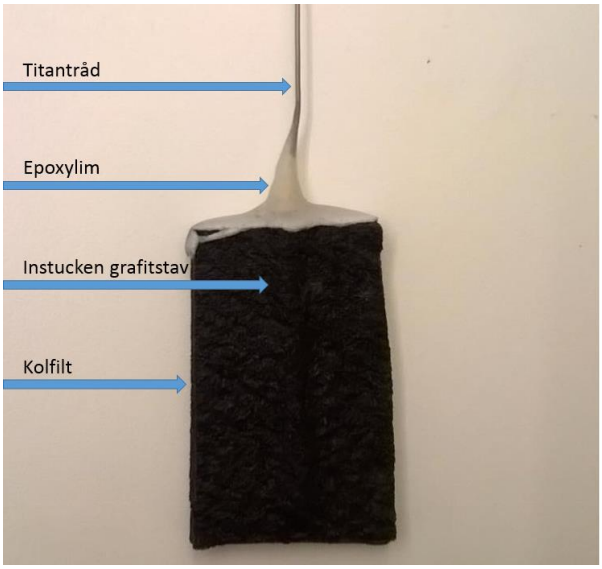
Tabell 1. Skillnader mellan lösning och bakterier i de olika försöksomgångarna.

Försöksomgång	Lösning i arbetande kamrar	Lösning i icke arbetande kamrar	Bakteriearter
1	50 % fermentationsavfall tillverkat enligt stycke 4.1.2 och 50 % buffertlösning	Buffertlösning	*C. acetobutylicum*
2	95 % buffertlösning och 5 % glycerolavfall, glukos tillsattes efter 42h för en total koncentration på 4 g/l	Buffertlösning	*C. acetobutylicum*
3	LB-medium* och 7 ml glycerolavfall (20 g/l glycerol i reaktorerna)	LB-medium*	*C. acetobutylicum*
4	LB-medium* och 6 ml glycerolavfall (16 g/l glycerol i reaktorerna)	LB-medium*	*S. oneidensis*
5	LB-medium* och 6 ml glycerolavfall (16 g/l glycerol i reaktorerna)	LB-medium*	*C. acetobutylicum* och *S. oneidensis*
6	LB-medium* och 6 ml glycerolavfall (16 g/l glycerol i reaktorerna)	LB-medium*	*C. acetobutylicum* och *S. oneidensis*
	*utan trypton och bacto peptone		

4.2.1 Förberedelse av elektroder och membran

Kolfilt (SIGRATHERM, SGL CarbonLtd.) klipptes i bitar om 5 gånger 3 cm och lika många, 14,5 cm långa, titantrådar förbereddes (figur 8). Samma antal grafitstavar med längd 4,5 cm och omkrets 3 mm togs fram varefter stavar och filt blötlades i först 1 M NaOH under en timme och därefter 1 M HCl i en timme. Stavar och filt fick slutligen ligga i avjoniserat vatten under natten för att tvätta bort eventuell syra. Kolfilten pressades försiktigt för att avlägsna bubblor och grafitstavarna urholkades på längden till ett djup av cirka 1 cm med borrmaskin.

Tidigare förberedda titantrådar limmades fast inuti borrhålen i grafitstavarna med silverbaserat elektriskt ledande lim (ITW, Chemtronics). Den sammansatta tråden och staven fördes sedan, längs långsidan, in i kolfilten varefter den anslutande sidan på kolfilten täcktes med vattenbeständigt epoxylim så att inget ledande lim längre var synligt (figur 8). Efter att epoxylimet härdat testades samtliga elektroder med avseende på resistans där en resistans på mindre än 20 Ω ansågs acceptabelt.



Figur 8. Färdigställd elektrod och dess komponenter. Ledande lim syns inte i bild då det täcks av epoxylim.

Protonutbytesmembran (Nafion 117, Ion Power, Inc.) förbereddes genom att inledningsvis koka dessa under en timme i 30 % väteperoxid vid 80 °C. Därefter kokades membranen först i 0,5 M svavelsyra följt av MQ vatten under en timme vardera vid 80 °C.

4.3 Databehandling

Behandling av den insamlade CV- och CA-datan gjordes med en egenformulerad algoritm i Matlab (appendix 8.3). Skriptet utnyttjar skillnaden mellan den undersökta punkten och de två närliggande punkterna. Om skillnaden är större än den önskade toleransen (appendix 8.1.1) tar programmet bort punkten. Skriptet använder även medelvärdet hos den uppmätta spänningen för att ta bort de punkter där potentiostaten sätter avvikande potential. När programmet tagit bort oönskade datapunkter presenteras datan i en eller två grafer beroende på önskemål. Strömmen beräknas genom att använda medelvärdet av den uppmätta strömmen över hela tidsintervallet exklusive de borttagna punkterna. Detta värde används för att erhålla en uppskattning för den totala laddning som producerats samt antal elektroner [11, 12].

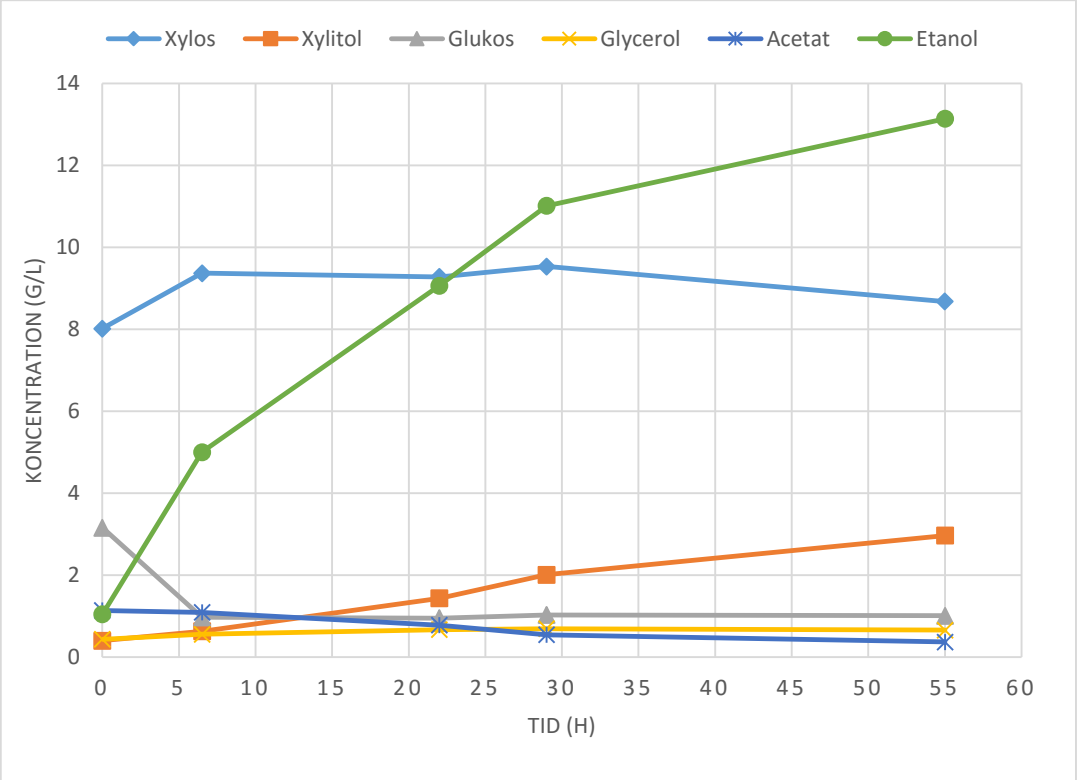
5. Resultat och diskussion

För att undersöka mikrobiell tillväxt avlästes optisk densitet vid varje provtagning av reaktorlösningar till och med försöksomgång 5. Analysen visade sig generera mycket osammanhängande och varierande data (appendix 8.1.4). Partiklar i reaktormediet tenderade att aggregera vilket sannolikt resulterade i förhöjda värden. Vid försök med glycerolavfall antog mediet ett mjölkaktigt vilket kan ha berott på att en emulsion uppstod. Vidare bedömdes metoden i sig som osäker eftersom den i bästa fall endast mäter suspenderad biomassa och inte tar hänsyn till eventuella biofilmer på elektroden och andra ytor. På grund av dessa omständigheter redovisas data för optisk densitet endast i appendix.

Vid borttagande av avvikande värden från rådata efter CA- och CV-analyser användes en egenformulerad algoritm (4.3). Metoden bedömdes tillräckligt analytiskt korrekt men en mer statistiskt rigorös process utgår istället från variansavvikelser.

5.1 Framställning av fermentationsavfall

Vid simultan sackarifiering och fermentation av lignocellulosa med *S. cerevisae* påvisades främst en produktion av xylitol (figur 9). Efter avslutad jäsning återstod 1 g/l glukos och 0,66 g/l glycerol hade producerats. Slutkoncentrationerna av xylos och xylitol uppgick till 8,7 g/l respektive 3,0 g/l. Dessa organiska föreningar kan potentiellt användas som substrat i BES då tidigare studier visat att *C. acetobutylicum* kan metabolisera xylos för att bilda butanol och små mängder etanol (19). För att undersöka denna möjlighet genomfördes försök med fermentationsavfallet som basnäring (5.1.1).

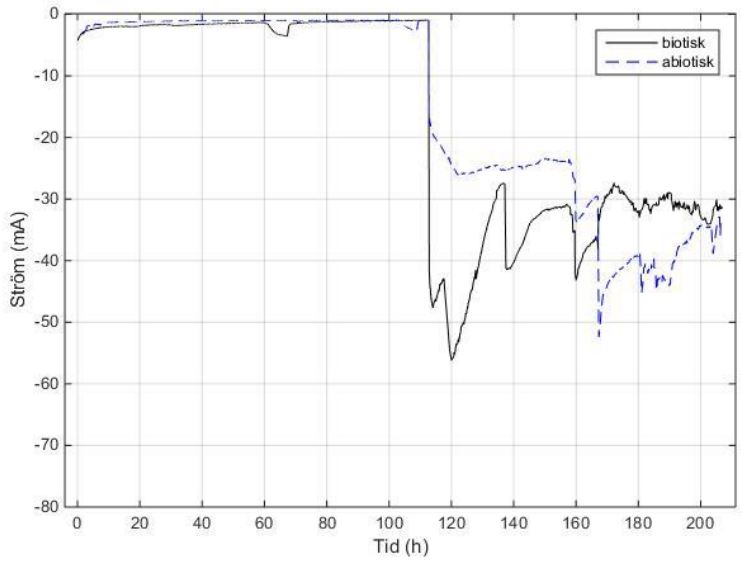


Figur 9. Koncentrationer av xylos, xylitol, glukos, glycerol, acetat och etanol plottat mot tiden för simultan sackarifiering och fermentation.

5.1.1 Försöksomgång 1: Fermentationsavfall med *C. acetobutylicum*

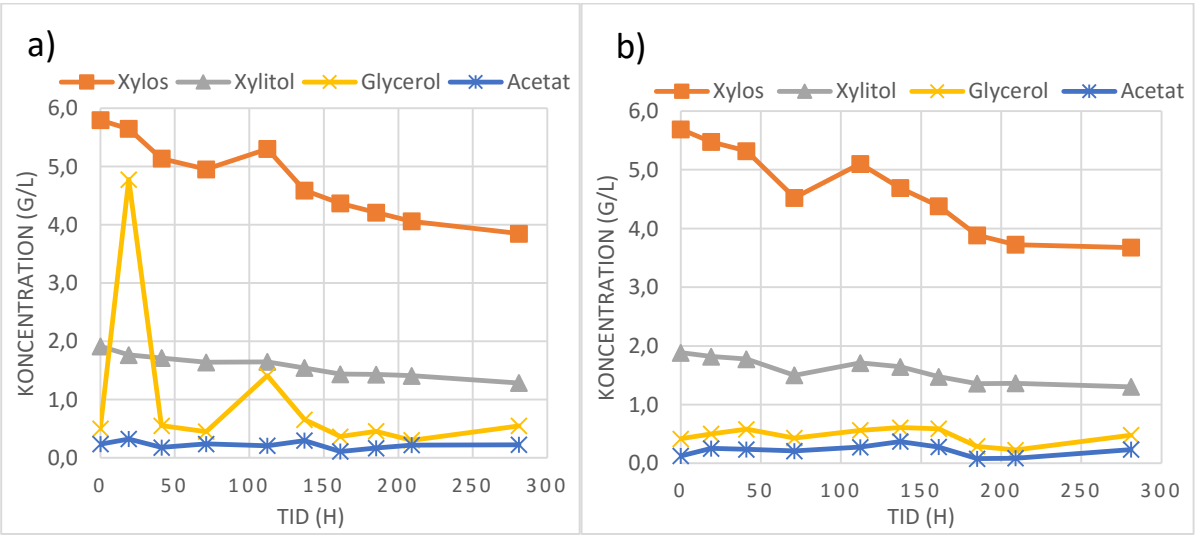
5.1.1.1 Arbetande katod

Inledningsvis genererade reduktion av organiska föreningar vid -800 mV mindre än 5 mA (figur 10). När potentialen sänktes till -1100 mV registrerades en markant ökning i strömstyrkan för både det biotiska och abiotiska systemet. Sannolikt möjliggjorde sänkningen nya reaktionsförlopp vilket resulterade i fler frigjorda elektroner. Vilken eller vilka reaktioner det rörde sig om kan inte utrönas ur resultatet. Då ökningen endast initialt var större för inokulerat system är det inte tydligt huruvida reaktionerna var biotiska eller abiotiska. Mot experimentets slut registrerades liknande värden för båda system.



Figur 10. Producerad ström för C. acetobutylicum med fermentationsavfall. Notera skillnaden då potentialen ändrades från -800 mV till -1100 mV efter cirka 110 h.

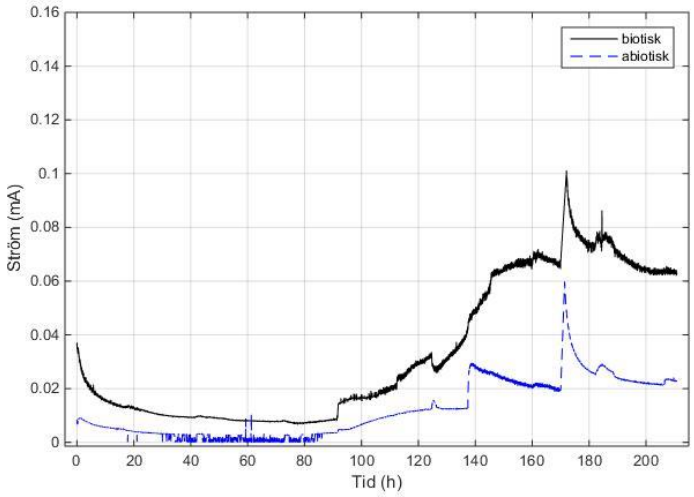
Xyloskoncentrationerna i system med arbetande katod minskade stadigt under hela försöket (figur 11). Eftersom minskningen skedde på likartat vis i både det biotiska och abiotiska systemet var den sannolikt inte resultatet av biologisk aktivitet. I det biotiska systemet observerades en tillfällig ökning av glycerol vid 19 h. Detta beror troligtvis på en felaktig mjukvarutolkning av data efter HPLC.



Figur 11. Koncentrationer av xylos, xylitol, glycerol och acetat plottat mot tiden för system med arbetande katod. a) Biotisk b) abiotisk. Inokulerad reaktor och kontroll uppvisar liknande trender.

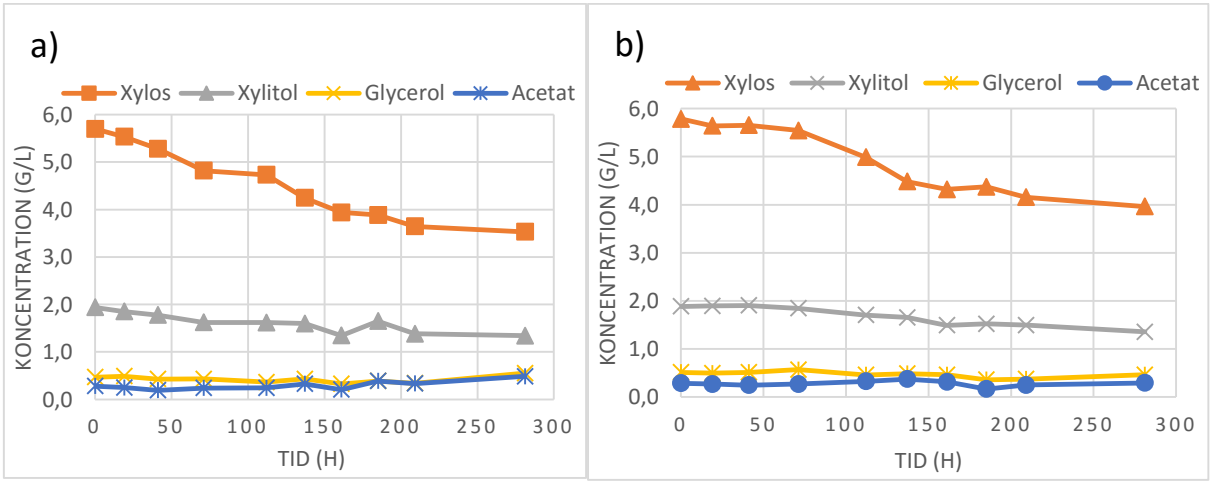
5.1.1.2 Arbetande anod

För system med anodisk potential ansatt till 0 mV uppvisade det biotiska systemet högre strömproduktion jämfört med den abiotiska kontrollen även om likartade trender observerades (figur 12). Initialt minskade strömmen för båda reaktorerna för att sedan öka till ett maximum kring 170 h. Strömmen var överlag låg och maxvärdet uppnådde endast cirka 0,1 mA. CA för arbetande anod uppvisade en trend som påminner om ett klassiskt tillväxtförlopp men det faktum att det abiotiska systemet följde det biotiska talar emot detta. Kombinationen låg ström, komplext substrat och samvariation öppnar upp för att det rör sig om en abiotisk oxidation av låghaltiga substratkomponenter.



Figur 12. Producerad ström för C. acetobutylicum med fermentationsavfall. Det biotiska systemet producerar något mer ström än kontroll. Anodernas potentialer hölls konstant vid 0 mV.

Likt för den arbetande katoden sjönk xyloskoncentrationen stadigt (figur 13). Koncentrationstrenderna för både arbetande anod och katod var mycket lika. Xylos och xylitol, som var de tilltänka primära kolkällorna för *C. acetobutylicum*, minskade närmast linjärt i samtliga systemen vilket talar emot att organismen fungerade som biokatalysator i dessa. Likt resonemanget fört för CA rör det sig snarare om abiotiska reaktioner med låghaltiga substratkomponenter. Den låga biologiska aktiviteten skulle kunna bero på okända toxiska substanser som följt med i processen sedan SSF.



Figur 13. Koncentrationer av xylos, xylitol, glycerol och acetat plottat mot tiden för system med arbetande anod. a) Biotisk b) abiotisk. Inokulerad reaktor och kontroll uppvisar liknande trender.

5.2 Glycerolavfall

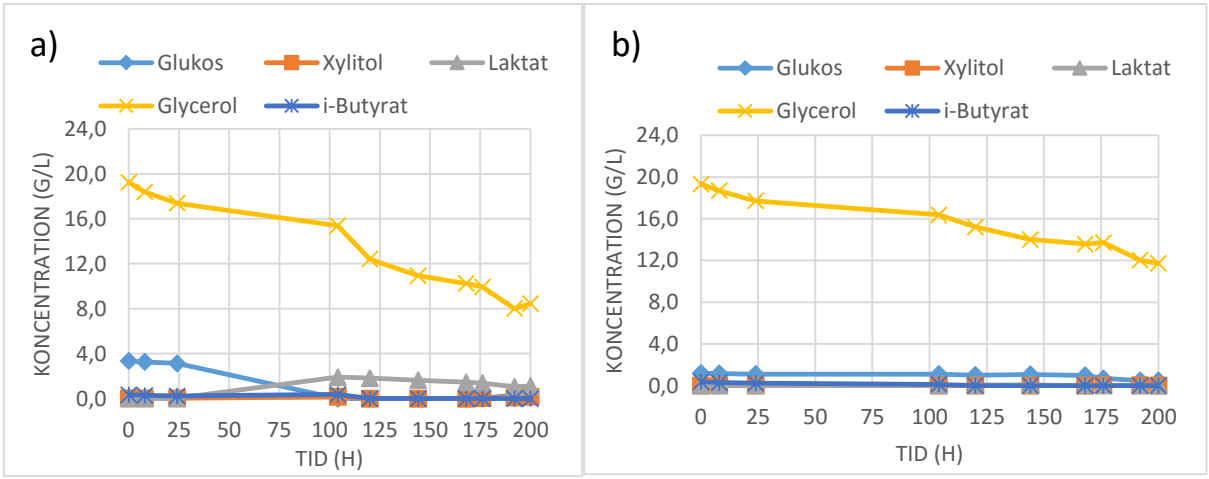
5.2.1 Försöksomgång 2: Glycerolavfall och glukos med *C.acetobutylicum*

Då fermentationsavfallet ansågs för toxiskt för *C. acetobutylicum* byttes substratet ut mot glycerolavfall med glukos tillsammans med buffert (appendix 8.2.1) för att underlätta bakteriell tillväxt.

5.2.1.1 Arbetande katod

Under försökets gång uppstod praktiska problem med den biotiska arbetande katodreaktorn. Vätskenivån sjönk vilket resulterade i att referenselektroden inte var i kontakt med lösningen. Potentiostaten applicerade då mycket starkare potential än önskad för att kompensera vilket ledde till otjänlig data (figur A1).

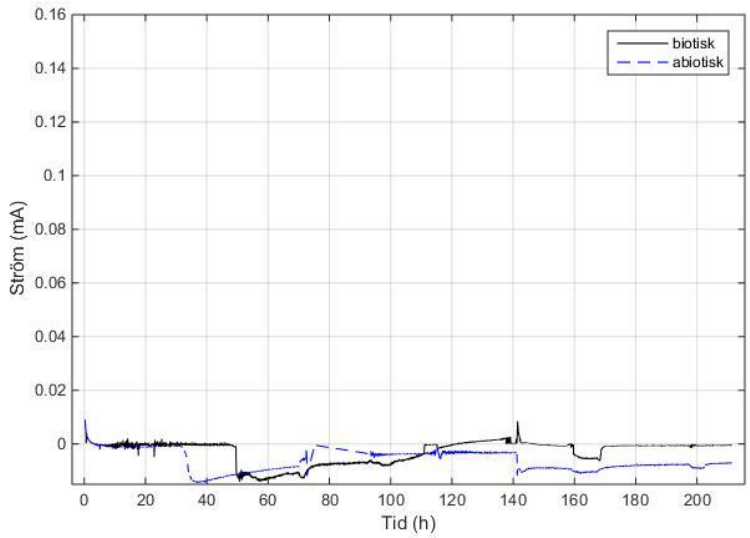
En viss laktatbildning skedde för den biotiska arbetande katoden vilket är ett tydligt tecken på biologisk aktivitet. Koncentrationen glycerol sjönk för båda system men var signifikant lägre för den biotiska arbetande katoden. Under försöket sjönk även glukoshalten för båda system men reduktionen för det biotiska systemet skedde långt före den abiotiska (figur 14). Koncentrationsförändringarna för dessa tre substanser talar för tillväxt i båda system. Det skulle då sannolikt röra sig om tillväxt av *C. acetobutylicum* i den biotiska arbetande katoden samt en kontamination i det abiotiska systemet. Det är även möjligt att resultatet påverkats av abiotiska redoxreaktioner involverande substanser i lösning.



Figur 14. Koncentrationer av glukos, xylitol, laktat, glycerol och i-butyrat plottat mot tiden för system med arbetande katod. a) Biotisk b) abiotisk.

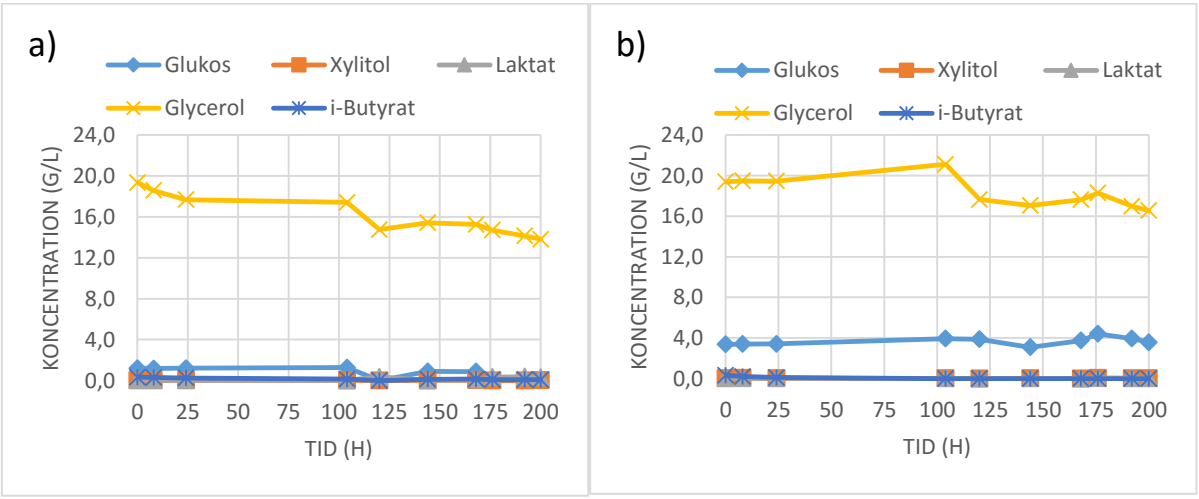
5.2.1.2 Arbetande anod

Den producerade strömmen uppgick till maximalt 0,015 mA för både den biotiska och abiotiska arbetande anoden vilket kan betraktas som försumbart lågt (figur 15). Skillnaden mellan det biotiska och abiotiska systemet var mycket liten.



Figur 15. Producerad ström för C. acetobutylicum med glycerolavfall och glukos. Den registrerade strömmen är låg för både biotisk och abiotisk reaktor vilket tyder på att ingen oxidation ägt rum.

Små mängder glycerol och glukos konsumerades i både biotiska och abiotiska reaktorer (figur 16). Förutom en mindre mängd laktat i inokulerat system producerades inga nya ämnen. Det samlade resultatet tyder på att *C. acetobutylicum* inte har någon betydande katalytisk effekt under anodiska betingelser.



Figur 16. Koncentrationer av glukos, xylitol, laktat, glycerol och i-butyrat plottat mot tiden för system med arbetande anod. a) Biotisk b) abiotisk.

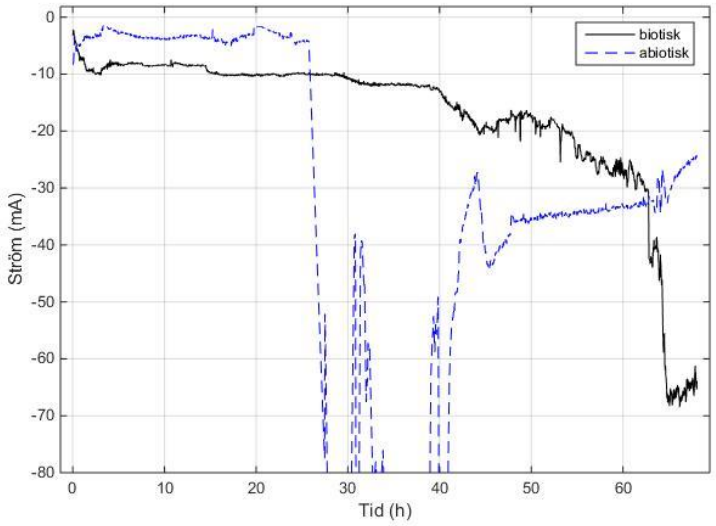
5.2.2 Försöksomgång 3: Glycerolavfall och LB-medium med *C. acetobutylicum*

För att underlätta tillväxt användes komplext LB-medium i kombination med glycerolavfall för försöksomgång 3.

5.2.2.1 Arbetande katod

Under tredje försöksomgången syntes initialt en markant skillnad mellan biotisk reaktor och abiotisk reaktor vid katodisk potential (figur 17). Efter cirka 25 h observerades en kraftig ökning i strömproduktion för kontrollen, detta beror sannolikt på problem med kvävgasflödet till systemet vilket kan ha medfört att syre trängde in. Syre kan reduceras till vatten [10] vilket då skulle leda till högre

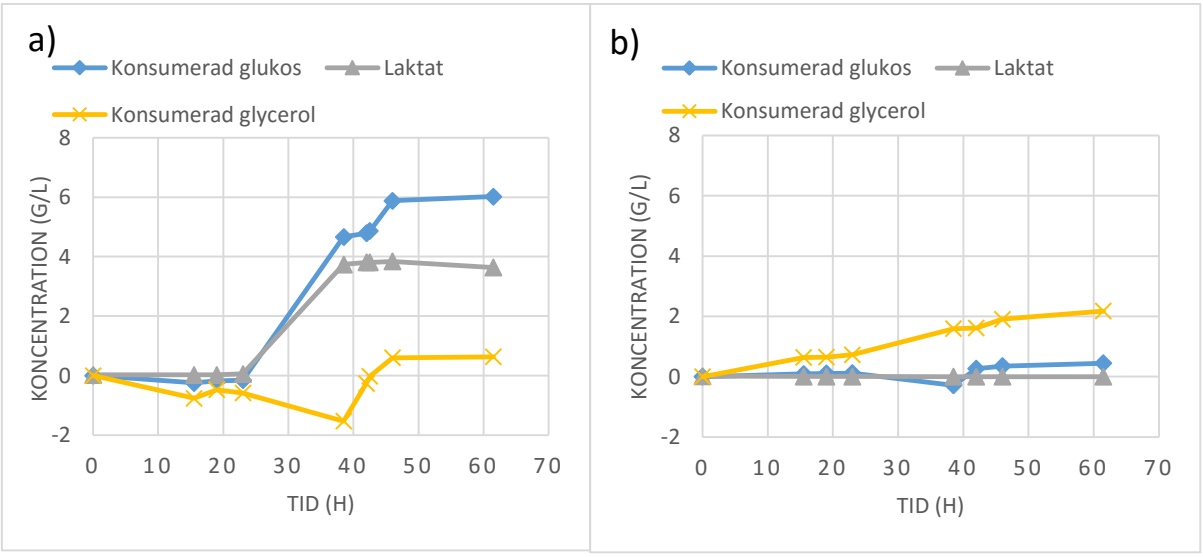
ström. Under försökets första 25 h bibehöll det biotiska systemet en kontinuerligt högre ström relativt det abiotiska. Trots de störningar som därefter uppstod förekommer sannolikt en signifikant biokatalytisk effekt i detta fall.



Figur 17. Producerad ström för C. acetobutylicum med glycerolavfall och glukos. Katodens potential hölls konstant vid -1300 mV för biotisk och abiotisk reaktor.

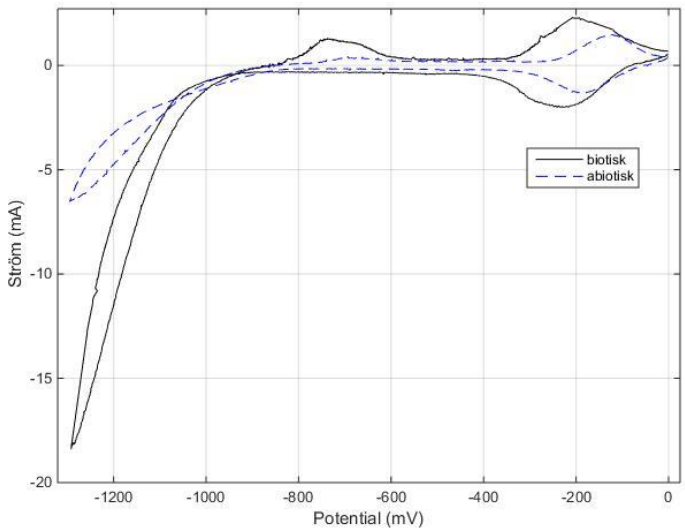
En viss laktatbildning samt konsumtion av glukos noterades vid den biotiska arbetande katoden (figur 18). Vid cirka 42 h tillsattes extra glukos i den biotiska reaktorn (tabell 1). Glukoskoncentrationen minskade marginellt i kontrollreaktorn men för samma system noterades en stadig nedgång av glycerolkoncentrationen. Inget laktat påvisades i den abiotiska reaktorn.

För den biotiska reaktorn konsumerades glukos i samband med produktion av laktat vilket sannolikt visar på biologisk aktivitet även om inga större mängder glycerol konsumerades (figur 18). Datan tyder på att *C. acetobutylicum* föredrar glukos över glycerol under rådande reaktorförhållanden. Koncentrationerna i kontrollreaktorn uppvisade svårförklarade trender. Om glycerolreduktionen berodde på abiotiska kemiska processer borde liknande trender noterats för det biotiska systemet.



Figur 18. Konsumerad mängd glukos och glycerol plottat tillsammans med laktatkoncentrationen mot tiden för system med arbetande katod. a) Biotisk b) abiotisk.

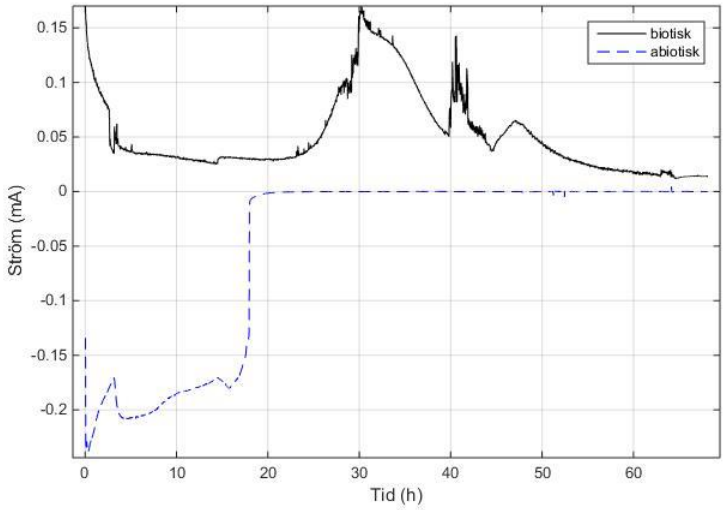
Då CV togs fram för arbetande katod observerades mycket låga värden för reducerande potential i intervallet -1300 till -900 mV (figur 19). Där visade sig övre delen av den standardmässiga s-formen (3.2.5) vilket indikerar biokatalytisk aktivitet. Denna region är intressant eftersom den visar skillnaden mellan det biotiska och abiotiska systemet under reducerande förhållanden. Kurvan för det biotiska systemet sträcker sig ned till cirka -18 mA medan den abiotiska endast når cirka -6 mA. Detta visar på att reaktioner i det biotiska systemet kontinuerligt kunde frigöra större laddningsmängd samt att motsvarande reaktioner saknades i kontrollreaktor. Sannolikt är det *C. acetobutylicum* som möjliggör dessa reaktioner.



Figur 19. CV för system med arbetande katod. Biotiska systemet producerade mer ström över i princip alla potentialer. Oxidation och reduktion av redoxmediator kan ses till höger i figuren (kring -200 mV).

5.2.2.2 Arbetande anod

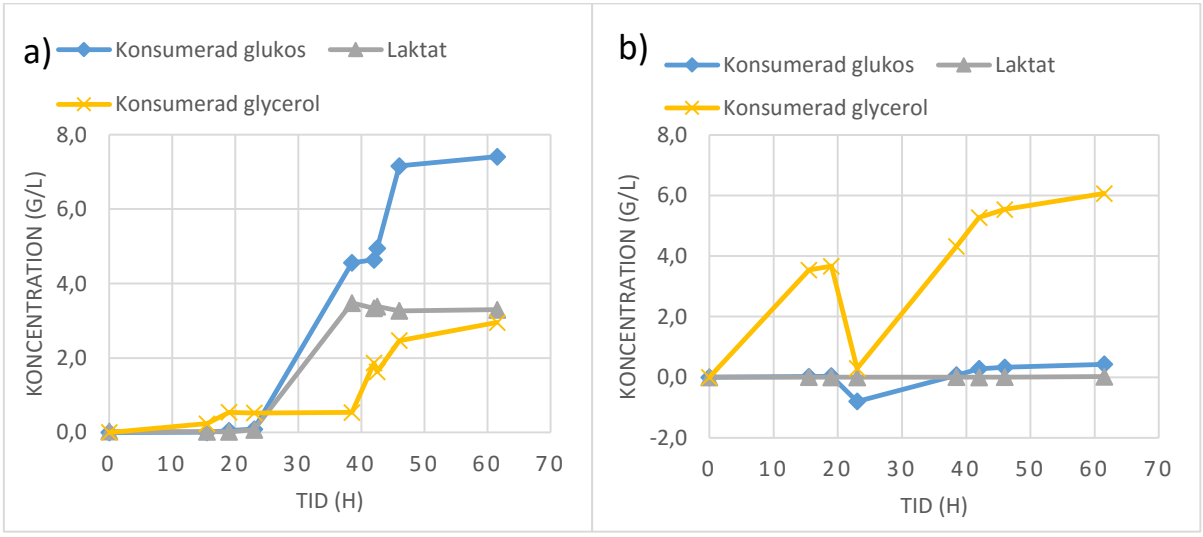
Abiotisk reaktor med arbetande anod producerade ström de första 20 timmarna för att sedan vara inaktiv (figur 20). Reaktorn tycks ha innehållit substans som reducerats vid 0 mV. För biotiska systemet var strömmen initialt låg för att sedan öka exponentiellt. Denna utveckling kan bero på en anpassningsfas följt av en tillväxtfas för bakterierna. Den övergripande strömproduktionen var låg och kan jämföras med tidigare försök (5.1.1.2). Två toppar i strömproduktionen registrerades vilket eventuellt kan härledas till *C. acetobutylicums* tvåfasiga metabolism (3.4.1). Denna hypotes förefaller dock något osannolik med tanke på den låga strömmen samt frånvaron av butanol och aceton (figur A4).



Figur 20. Producerad ström under tredje försöksomgången då biotisk arbetande anod med glycerolavfall och glukos inokulerats med C. acetobutylicum. Anodens potential hölls konstant vid 0 mV för båda reaktorer.

En viss laktatbildning noterades i samband med konsumtion av glukos i biotisk arbetande anod (figur 21). Även en mindre mängd glycerol tycks ha konsumerats. Varken glukoskonsumtion eller laktatproduktion observerades i kontrollreaktorn även om glycerolkoncentrationen gick ned.

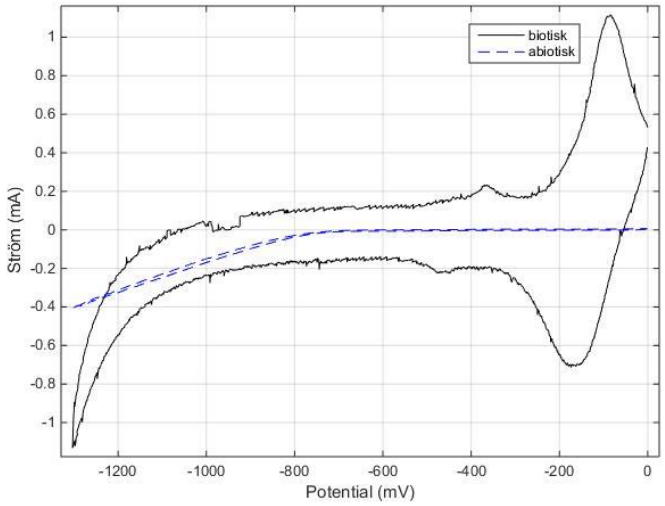
Simultan laktatproduktion och glukoskonsumtion visar på sannolik tillväxt för biotiska arbetande anoden. Då konsumtion av glukos inleddes först tycks *C. acetobutylicum* föredra denna som energikälla. Mikroorganismen verkar inte föredra anodiska förhållanden då strömmen var betydligt lägre jämfört med arbetande katod. Likt vid katodiska förhållanden uppvisar kontrollreaktorn svårförklarade trender som eventuellt är resultatet av abiotiska reaktionsförlopp.



Figur 21. Konsumerad mängd glukos och glycerol plottat tillsammans med laktatkoncentrationen mot tiden. a) Biotiska arbetande anoden. b) Abiotiska arbetande anoden.

Efter genomfört CV kunde två maximum identifieras vid -200 mV och -100 mV (figur 22). Den maximala strömstyrkan utgjorde uppskattningsvis en tjugondel av maximum för den katodiska reaktorn (figur 19) vilket talar för mer gynnsamma förhållanden i denna. Biotiska systemet producerade överlag mer ström än kontrollen vilket syns tydligt på högersidan av grafen. Denna region är intressant eftersom den visar skillnaden mellan det biotiska och abiotiska systemet under oxiderande förhållanden.

Strömmen gick ned direkt efter ett maxvärde vid cirka -100 mV utan att det uppstod någon tydlig s-form (3.2.5). Detta tyder på att den skapade strömmen inte åstadkommits genom biokatalys.



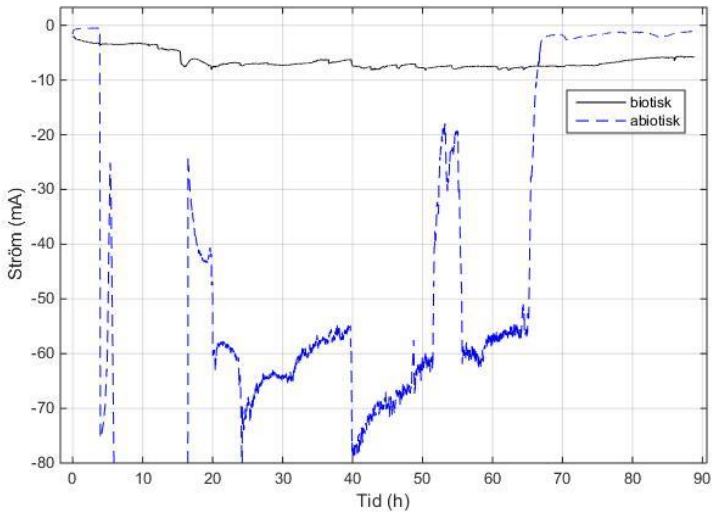
Figur 22. CV för system med arbetande anod. Notera den tiofaldiga nedskalningen av y-axeln jämfört med katodisk reaktor. Det biotiska systemet producerar mer ström över i princip alla potentialer. Oxidation och reduktion av redoxmediatorn kan ses till höger i figuren.

5.2.3 Försöksomgång 4: Glycerolavfall och LB-medium med *S. oneidensis*

Då *S. oneidensis* tidigare visats kunna konsumera laktat (25), vilket producerades under försöksomgång 3, undersöktes i första hand hur den hanterar glycerolavfall och LB-medium som enda substrat jämfört med *C. acetobutylicum*. Detta i syfte att senare jämföra med blandkultur.

5.2.3.1 Arbetande katod

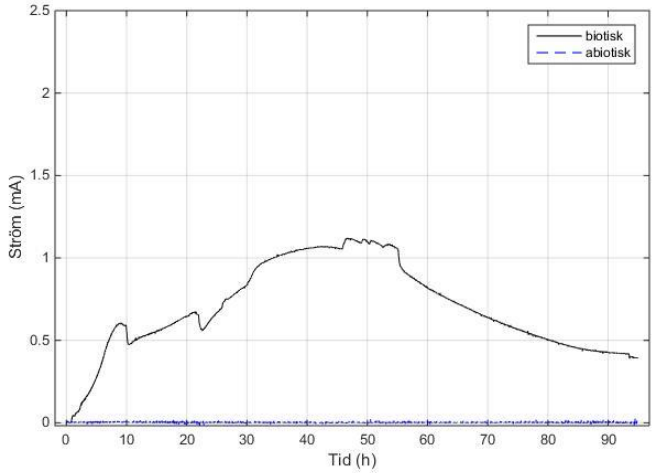
En relativt jämn strömproduktion observerades i den biotiska reaktorn (figur 23). I den abiotiska arbetande katoden ökade strömmen markant efter cirka 5 h från att ha befunnit sig omkring noll. Detta kan, likt under försöksomgång 3, bero på att problem med kvävgasflödet in till reaktorn uppstod vilket då kan ha lett till att syre trängde in.



Figur 23. Producerad ström för S. oneidensis med glycerolavfall och LB-medium. Kontrollen har liknande utseende som för motsvarande experiment under försöksomgång 3. Katodens potential hölls konstant vid -1300 mV.

5.2.3.2 Arbetande anod

Strömmen för biotiska reaktorn ökade till ett toppvärde efter cirka 40 h för att sedan avta nästintill linjärt (figur 24). Detta är en tiofaldig ökning jämfört med försök med *C. acetobutylicum* vid anodisk potential. Kontrollreaktor uppvisade nästintill obefintlig strömproduktion vilket talar för ett katalytiskt bidrag från bakterien. Den inledande ökningen skulle kunna förklaras av bakteriell tillväxt och dess efterföljande avtagande på grund av substratdepletion. En laddning på cirka 237 C producerades under försöket [13].



Figur 24. Producerad ström för S. oneidensis med glycerolavfall och LB-medium. Notera den cirka tiofaldiga skalningen av y-axeln relativt figur 20. Skillnaden mellan biotiska reaktorn och kontrollen är tydlig. Anodens potential hölls konstant vid 0 mV.

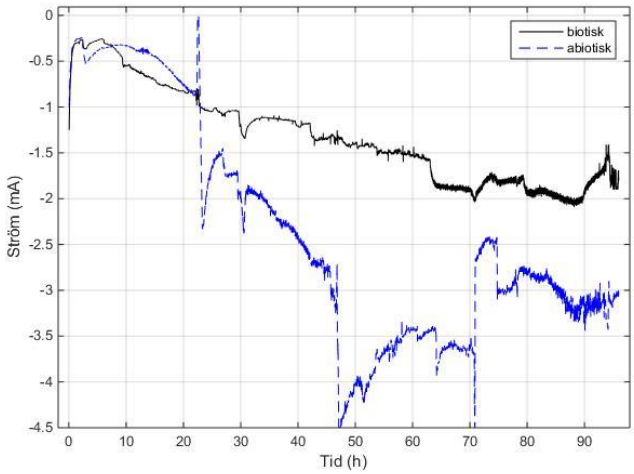
Ingen glukos eller glycerol konsumerades under försöket (figur A5) men det bildades ström i båda inokulerade reaktorer samtidigt som ingen ström observerades i kontrollreaktorerna. Detta tyder på att *S. oneidensis* har katalyserat redoxreaktioner av något slag som inte involverat dessa ämnen. Att okänd substans reagerat är ett möjligt scenario då odlingsmediet som användes var komplext och innehöll jästextrakt.

5.2.4 Försöksomgång 5: Glycerolavfall och LB-medium med *C. acetobutylicum* och *S. oneidensis*

För att undersöka huruvida ett metaboliskt utbyte mellan *C. acetobutylicum* och *S. oneidensis* var möjligt användes en blandkultur i försöksomgång 5. Det hypotetiska utbytet skulle då bestå av att *C. acetobutylicum* producerade laktat som *S. oneidensis* sedan konsumerade. För att testa hypotesen jämfördes data från CA.

5.2.4.1 Arbetande katod

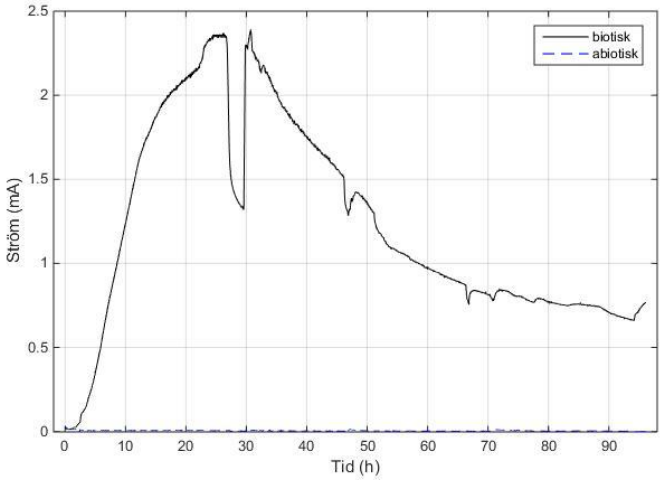
Det biotiska systemet uppvisade gradvis ökande strömproduktion under experimentets gång. Det abiotiska systemet visade kraftigt varierande strömproduktion efter cirka 20 h (figur 25). En anledning till detta kan återigen bero på problem med kvävgasflödet. Jämfört med föregående försök med monokulturer för respektive bakterieart producerades mindre ström i det biotiska systemet med arbetande katod. Detta tyder på att en blandad kultur inte ger fördelaktig biokatalys under reducerande förhållanden. En förklaring till detta kan vara att det uppstår konkurrens om substrat snarare än samverkande metabolismer mellan bakterierna under dessa förhållanden.



Figur 25. Producerad ström för blandkultur av S. oneidensis och C. acetobutylicum med glycerolavfall och LB-medium. Lägre ström registrerades jämfört med monokulturer under reducerande förhållanden. Katodens potential hölls konstant vid -1300 mV.

5.2.4.2 Arbetande anod

Likt den arbetande anoden i tidigare försök så ökade strömproduktionen initialt tills en topp nås, cirka 2,5 mA i detta fall, för att sedan gradvis minska (figur 26). Denna trend skulle kunna bero på bakteriell tillväxt. För arbetande anod var den producerade strömmen större jämfört med monokulturen innehållande endast *S. oneidensis*. Totalt genererades cirka 425 C [13], en ökning med 79 %. Detta indikerar att det under anodiska förhållanden är fördelaktigt med blandkultur.



Figur 26. Producerad ström för blandkultur av S. oneidensis och C. acetobutylicum med glycerolavfall och LB-medium. Jämfört med samma försök med endast S. oneidensis registrerades mer ström. I övrigt har kurvorna liknande utseende. Anodens potential hölls konstant vid 0 mV.

Ingen laktat har bildats i någon reaktor under försökets gång (figur A6). Det är möjligt att *S. oneidensis* konsumerade det laktat som *C. acetobutylicum* producerat vilket då skulle förklara ökningen i strömproduktion. Denna hypotes kan dock inte bekräftas med erhållen data då det är möjligt att inget laktat har bildats över huvud taget.

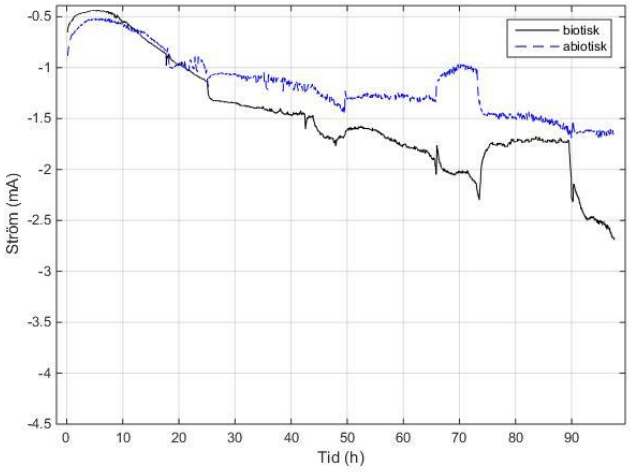
5.2.5 Försöksomgång 6: Glycerolavfall och LB-medium med *C. acetobutylicum*

Under försöksomgång 6 användes samma försöksparametrar som vid försöksomgång 5. För att undersöka hypotesen rörande samverkande metabolism inokulerades reaktorerna först med endast *C.*

acetobutylicum. Syftet var att vid observerad laktatproduktion inokulera med *S. oneidensis* och följa laktatkoncentrationen och strömproduktionens utveckling.

5.2.5.1 Arbetande katod

Den producerade strömmen i den arbetande katoden (figur 27) är jämförbar med föregående försök (figur 25). Även om strömmen i den abiotiska reaktorn var skild från noll så var den mindre än den biotiska reaktorns producerade ström.



Figur 27. Producerad ström för C. acetobutylicum med glycerolavfall och LB-medium. Katodens potential hölls konstant vid -1300 mV.

5.2.5.2 Arbetande anod

Likt arbetande katod producerades mycket lite ström (figur A2). Efter drygt 90 h nåddes en topp på cirka 0,07 mA vilken kan betraktas som nästintill obefintligt. Ingen laktatproduktion eller glycerol- och glukoskonsumtion påvisades (figur A7). På grund av detta inokulerades aldrig reaktorerna med *S.oneidensis* då de inte skulle ha något näringsämne att växa på. Dessa resultat tyder på att väldigt lite hände i reaktorerna under denna försöksomgång. En anledning till detta kan vara sämre tillväxt orsakat av en lång lagfas då bakterierna togs direkt ur kylen vid inokulering.

6. Slutsatser

Arbetet med att undersöka mikroorganismernas förmåga att katalysera redoxreaktioner i BES för de två typerna av avfall som biologiska katalysatorer i bioelektrokemiska reaktioner, för de två typerna av avfall, är inte slutfört men detta projekt är en bit på vägen. Möjligheten att bedöma bakteriernas katalytiska effekt begränsas av att resultaten inte är tillräckligt entydiga. Definitiva slutsatser är svåra att dra då tillförlitligheten i erhållen data är, för de flesta försöken, relativt låg. Detta beror delvis på praktiska problem med reaktorerna men framförallt på bristande kontinuitet i det laborativa arbetet, särskilt i början av projektet. För att statistiskt säkerställa resultat krävs upprepningar av genomförda experiment.

Resultaten stödjer dock delvis tidigare observationer gällande *C. acetobutylicum*. Bakterien föredrar katodiska betingelser vilket bekräftas av en större strömproduktion under reducerande förhållanden för samtliga experiment. Ingen biokatalytisk effekt påvisades vid nedbrytning av varken avfallsvatten från fermentation eller glycerolavfall. Resultaten är alltför motstridiga, möjligtvis på grund av kontamination och oförmåga att bibehålla anaerob miljö i reaktorerna.

De två försök som gjordes med *S. oneidensis* vid anodisk potential visar tydlig skillnad mellan inokulerat system och kontroll. Detta pekar starkt mot att bakterien har en biokatalytisk effekt på oxidering av glycerolavfall. Blandkultur vid samma betingelser resulterade i mer producerad ström jämfört med monokulturer vilket indikerar att ett visst metaboliskt utbyte förekommit. Med största sannolikhet bestod detta av att *C. acetobutylicum* producerade laktat som *S. oneidensis* sedan konsumerade. Eftersom ingen laktat producerades i sista försöksomgången kunde hypotesen inte testas vilket öppnar upp för framtida forskning.

Ett första steg vid framtida forskning skulle kunna vara att upprepa experiment från försöksomgång 3 till 6 i syfte att bekräfta hypotesen gällande det metaboliska utbytet mellan bakteriearterna. För att undvika de problem som uppstod är det viktigt med noggrann tätning av reaktorkärlen för att bibehålla anaerob miljö. Förodling av bakterierna måste även ske på samma sätt inför varje försök för att säkerställa bakteriernas viabilitet vid inokulering. Vidare skulle det vara intressant att undersöka om blandkultur är fördelaktigt vid strömproduktion i MFC. En naturlig följd skulle sedan vara att ta fram specialiserade stammar med ökad tolerans och tillväxt genom serieodling i ökande halt glycerolavfall. Ett effektivare system skulle kunna ge stora energivinster, ökat intresse för BES och starkare ekonomisk konkurrenskraft gentemot processer som utnyttjar fossila bränslen. Få vetenskapliga rapporter för blandkultur med *S. oneidensis* och *C. acetobutylicum* i BES finns publicerade. Detta i kombination med projektets resultat motiverar fortsatta studier inom området. Vidare forskning inom biokatalys av glycerolavfall i BES krävs för att effektivt kunna utnyttja energin i avfallet. Detta skulle bidra till en mer hållbar produktion av biodiesel och i förlängningen stärka ekonomiska och miljöbetingade incitament för en biobaserad ekonomi.

7. Källförteckning

1. Bevill K. World's largest cellulosic ethanol plant breaks ground in Italy [Internet]. Ethanol Producer Magazine. 2011 [citerad 2016 Feb 11]. Hämtad från: http://ethanolproducer.com/articles/7659/worlds-largest-cellulosic-et hanol-plant-breaks-ground-in-italy
2. Gibson L. Bioethanol plant in Denmark inaugurated [Internet]. Biomass Magazine. 2009 [citerad 2016 Feb 11]. Hämtad från: http://www.biomassmagazine.com/articles/3251/bioethanol-plant-in-denmark-inaugurated/
3. Lane J. GranBio starts cellulosic ethanol production at 21 million gallon plant in Alagoas, Brazil [Internet]. BiofuelsDigest. 2014 [citerad 2016 Feb 11]. Hämtad från: http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/09/24/granbio-starts-cellulosic-ethanol-production-at-21-mgy-plant-in-brazil/
4. Quispe CAG, Coronado CJR, Carvalho Jr. JA. Glycerol: production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. Renew Sustain Energy Rev [Internet]. 2013;27:475–93. DOI: 10.1016/j.rser.2013.06.017
5. Rabaey K, Verstraete W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. Trends Biotechnol [Internet]. 2005;23(6):291–8. DOI: 10.1016/j.tibtech.2005.04.008
6. McCarty PL, Bae J, Kim J. Domestic wastewater treatment as a net energy producer-can this be achieved? Environ Sci Technol. 2011;45(17):7100–6. DOI: 10.1021/es2014264
7. Heidrich ES, Edwards SR, Dolfing J, Cotterill SE, Curtis TP. Performance of a pilot scale microbial electrolysis cell fed on domestic wastewater at ambient temperatures for a 12month period. Bioresour Technol [Internet]. 2014;173:87–95. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.09.083
8. Logan BE, Rabaey K. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. Science (80-). 2012;337(6095):686–90. DOI: 10.1126/science.1216852
9. Logan BE, Call D, Cheng S, Hamelers HVM, Sleutels THJA, Jeremiasse AW, et al. Microbial Electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. Environ Sci Technol. 2008;42(23):8630–40. DOI: 10.1021/es801553z
10. Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, et al. Microbial fuel cells: methodology and technology †. Environ Sci Technol. 2006;40(17):5181–92. DOI: 10.1021/es0605016
11. Chaplin M. Water redox processes [Internet]. Water structure and science. 2015 [citerad 2016 May 8]. Hämtad från: http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_redox.html
12. Schroder U. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. Phys Chem Chem Phys. 2007;9(21):2619–29. DOI: 10.1039/B703627M
13. Nordling C, Österman J. Physics Handbook for Science and Engineering. 8:7 ed. Lund: Studentlitteratur AB; 2006. 208 p.
14. Takagi M, Abe S, Suzuki S, Emert GH, Yata N. A method for production of ethanol directly from cellulose using cellulase and yeast. In: T. K. Ghose, editor. Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial Protein. Delhi: IIT Delhi och SFIT Zurich; 1977. p. 551–71.
15. Wyman CE. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. Bioresour Technol. 1994;50(1):3–15. DOI: 10.1016/0960-8524(94)90214-3
16. Nölling J, Breton G, Omelchenko M V, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, et al. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. J Bacteriol. 2001;183(16):4823–38. DOI: 10.1128/JB.183.16.4823-4838.2001
17. Harnisch F, Freguia S. A basic tutorial on cyclic voltammetry for the investigation of electroactive microbial biofilms. Chem Asian J. 2012;7(3):466–75. DOI: 10.1002/asia.201100740
18. Kim TS, Kim BH. Electron flow shift in *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically introduced reducing equivalent. Biotechnol Lett. 1988;10(2):123–8. DOI: 10.1007/BF01024638
19. Ounine K, Petitdemange H, Raval G, Gay R. Acetone-butanol production from pentoses by

Clostridium acetobutylicum. Biotechnol Lett. 1983 Sep;5(9):605–10. DOI: 10.1007/BF00130841
20. Kudahettige-Nilsson RL, Helmerius J, Nilsson RT, Sjöblom M, Hodge DB, Rova U. Biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum* using xylose recovered from birch Kraft black liquor. Bioresour Technol. 2015;176:71–9. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.012
21. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. J Bacteriol. 1994;176(5):1443–50. Hämtad från: http://jb.asm.org/content/176/5/1443.abstract
22. Finch AS, Mackie TD, Sund CJ, Sumner JJ. Metabolite analysis of *Clostridium acetobutylicum*: fermentation in a microbial fuel cell. Bioresour Technol. 2011;102(1):312–5. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.149
23. Kracke F, Vassilev I, Krömer JO. Microbial electron transport and energy conservation - the foundation for optimizing bioelectrochemical systems [Internet]. Frontiers in Microbiology. 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00575
24. Heidelberg JF, Paulsen IT, Nelson KE, Gaidos EJ, Nelson WC, Read TD, et al. Genome sequence of the dissimilatory metal ion–reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. Nat Biotechnol. 2002;20:1118–23. DOI: 10.1038/nbt749
25. Tang YJ, Meadows AL, Kirby J, Keasling JD. Anaerobic central metabolic pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1 reinterpreted in the light of isotopic metabolite labeling. J Bacteriol. 2007;189(3):894–901. DOI: 10.1128/JB.00926-06
26. Tang YJ, Meadows AL, Keasling JD. A kinetic model describing *Shewanella oneidensis* MR-1 growth, substrate consumption, and product secretion. Biotechnol Bioeng. 2007;96(1):125–33. DOI: 10.1002/bit.21101
27. Rosenbaum M, Cotta MA, Angenent LT. Aerated *Shewanella oneidensis* in continuously fed bioelectrochemical systems for power and hydrogen production. Biotechnol Bioeng. 2010;105(5):880–8. DOI: 10.1002/bit.22621
28. Xafenias N, Anunobi MO, Mapelli V. Electrochemical startup increases 1,3-propanediol titers in mixed-culture glycerol fermentations. Process Biochem. 2015;50(10):1499–508. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.06.020
29. Xafenias N. Cr(VI) removal in bioelectrochemical systems with electrodes as electron donors [Internet]. University of Southampton, Faculty of Engineering and the Environment; 2014. Hämtad från: http://eprints.soton.ac.uk/363130/
30. Bahl H, Andersch W, Braun K, Gottschalk G. Effect of pH and bytyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridiom acetobutylicum* grown in continuous culture. Appl Microbiol Biotechnol. 1982;14(1):17–20. DOI: 10.1007/BF00507998
31. Karube I, Matsunaga. Tadashi, Tsuru S, Suzuki S. Biochemical fuel cell utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*. Biotechnol Bioeng. 1977;19(11):1727–33. DOI: 10.1002/bit.260191112
32. Singh AM, Sharma VN. Electricity generation by *Saccharomyces cerevisae* and *Clostridium acetobutylicum* via microbial fuel cell technology: a comparative study. Adv Biol Res (Rennes). 2010;4(4):217–23.
33. Peguin S, Soucaille P. Modulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* by iron limitation and methyl viologen addition. Appl Envir Microbiol. 1995;61(1):403–5. Hämtad från: http://aem.asm.org/cgi/content/long/61/1/403
34. Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. Yeast. 1992;8(7):501–17. DOI: 10.1002/yea.320080703

8. Appendix

8.1 Data och grafer/figurer

8.1.1 Försöksparametrar och resultat

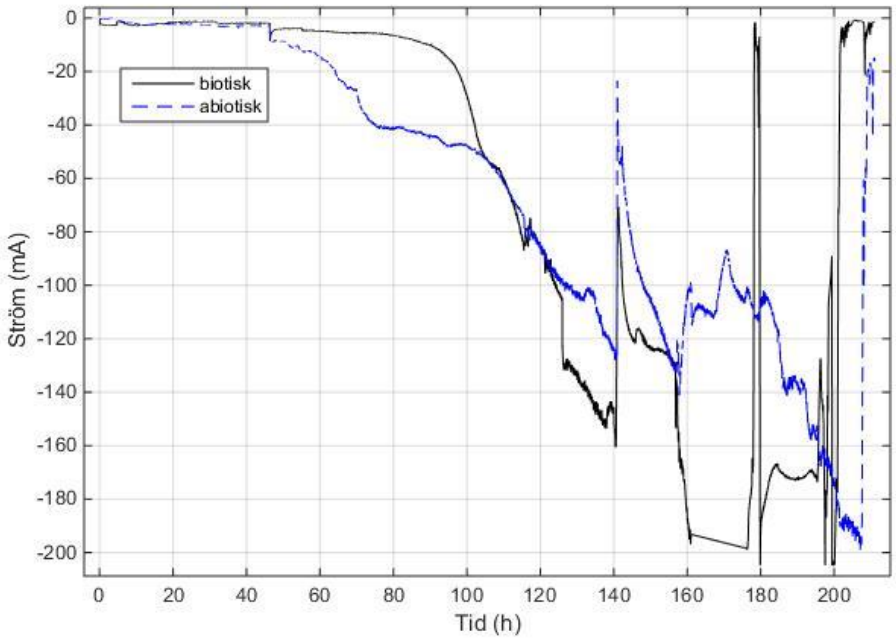
Tabell A1 är en sammanfattande tabell med försöksparametrar samt experimentella resultat från både CV- och CA-försök. Toleransen valdes generellt till ett så lågt värde som möjligt för att inte ta bort fler punkter än nödvändigt, som tumregel inte fler än en tredjedel.

Tabell A1. Försöksparametrar samt experimentella resultat för CA och CV.

Försök	Elektrod	Abiotisk/biotisk	Bakterie	pH-värde	Potential [mV]	Tid[h]	Ström [mA]	Laddning[C]	Tolerans	% borttagna punkter CA	% borttagna punkter CV
B1	katod	biotisk	*C. acetobutylicum*	5,5	-800 och -1100	281	-16,8542	-1,26E+04	0,01	34,1698	
B2	katod	abiotisk	*C. acetobutylicum*	5,5	-800 och -1100	281	-15,1782	-1,14E+04	0,01	29,7603	
B3	anod	biotisk	*C. acetobutylicum*	7	0	281	0,033	25,0516	0,001	11,9735	
B4	anod	abiotisk	*C. acetobutylicum*	7	0	281	0,0154	11,6914	0,001	9,6625	
C1	katod	biotisk	*C. acetobutylicum*	7	-1100 och -1300	200	0,033	25,0516	0,01	0,0798	
C2	katod	abiotisk	*C. acetobutylicum*	7	-1100 och -1300	200	0,0154	11,6914	0,0005	15,2818	
C3	anod	biotisk	*C. acetobutylicum*	7	0	200	-0,0039	-2,9824	0,0005	7,1175	
C4	anod	abiotisk	*C. acetobutylicum*	7	0	200	0,1034	78,5952	0,0005	5,9388	
D1	katod	biotisk	*C. acetobutylicum*	7	-1300	62	-17,4343	-4,28E+03	1	1,6141	18, tol: 0.1
D2	katod	abiotisk	*C. acetobutylicum*	7	-1300	62	-38,6665	-9,48E+03	0,3	24,0646	0.5, tol: 0.1
D3	anod	biotisk	*C. acetobutylicum*	7	0	62	0,0516	12,658	0,01	0,538	2.3846, tol: 0.05
D4	anod	abiotisk	*C. acetobutylicum*	7	0	62	-0,0499	-12,2444	0,01	0,1223	0.3846, tol: 0.05
E1	katod	biotisk	*S. oneidensis*	7	-1300	90	-6,4708	-2,07E+03	0,1	0,7874	
E2	katod	abiotisk	*S. oneidensis*	7	-1300	90	-51,9795	-1,66E+04	0,8	19,8538	
E3	anod	biotisk	*S. oneidensis*	7	0	90	0,6924	236,7238	0,01	0,7719	
E4	anod	abiotisk	*S. oneidensis*	7	0	90	0,0164	5,6133	0,01	10,5282	
F1	katod	biotisk	*Mixed culture*	7	-1300	100	-1,3107	-453,0636	0,1	1,3359	
F2	katod	abiotisk	*Mixed culture*	7	-1300	100	-2,4574	-849,2699	0,1	3,2624	
F3	anod	biotisk	*Mixed culture*	7	0	100	1,2297	425,419	0,01	2,1498	
F4	anod	abiotisk	*Mixed culture*	7	0	100	0,005	1,743	0,01	0,0694	
G1	katod	biotisk	*C. acetobutylicum*	7	-1300	100	-1,4791	-519,7744	0,01	2,9025	
G2	katod	abiotisk	*C. acetobutylicum*	7	-1300	100	-1,1676	-410,0466	0,01	29,7865	
G3	anod	biotisk	*C. acetobutylicum*	7	0	100	0,0114	4,0039	0,001	11,3959	
G4	anod	abiotisk	*C. acetobutylicum*	7	0	100	0,1209	42,4847	0,001	60,7387	

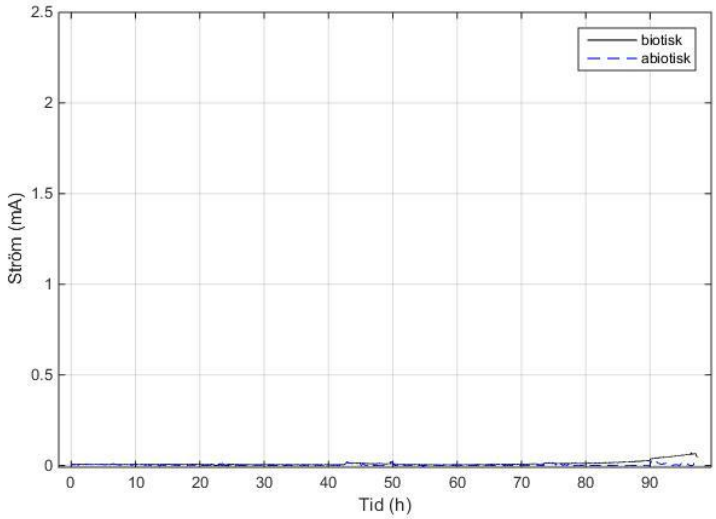
8.1.2 Chrono Amperogram

CA för reaktor med katodisk potential under andra försöksomgången (figur A1) visar kraftigt varierande värden. Eftersom vätskenivån sjönk under referenselektroden applicerades en för stor potential vilket ledde till otjänliga data.



Figur A1. Producerad ström för C. acetobutylicum med glycerolavfall och glukos. Anodens potential hölls inte konstant vid -1300 mV vilket ledde till otjänliga data.

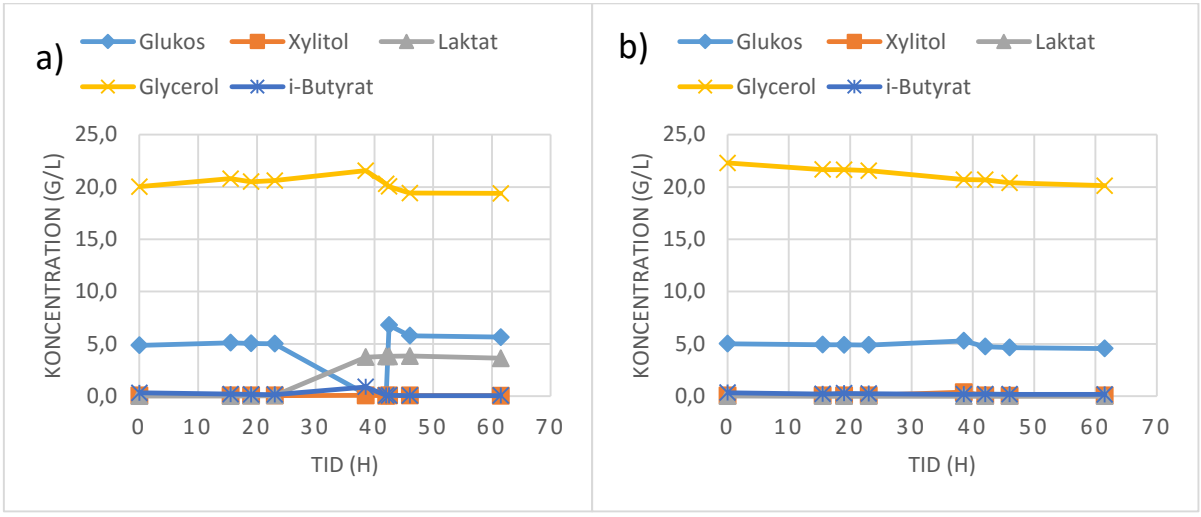
CA för reaktor med inokulerad anod vid försöksomgång 6 visade att näst intill ingen ström producerades under försökets gång (figur A2).



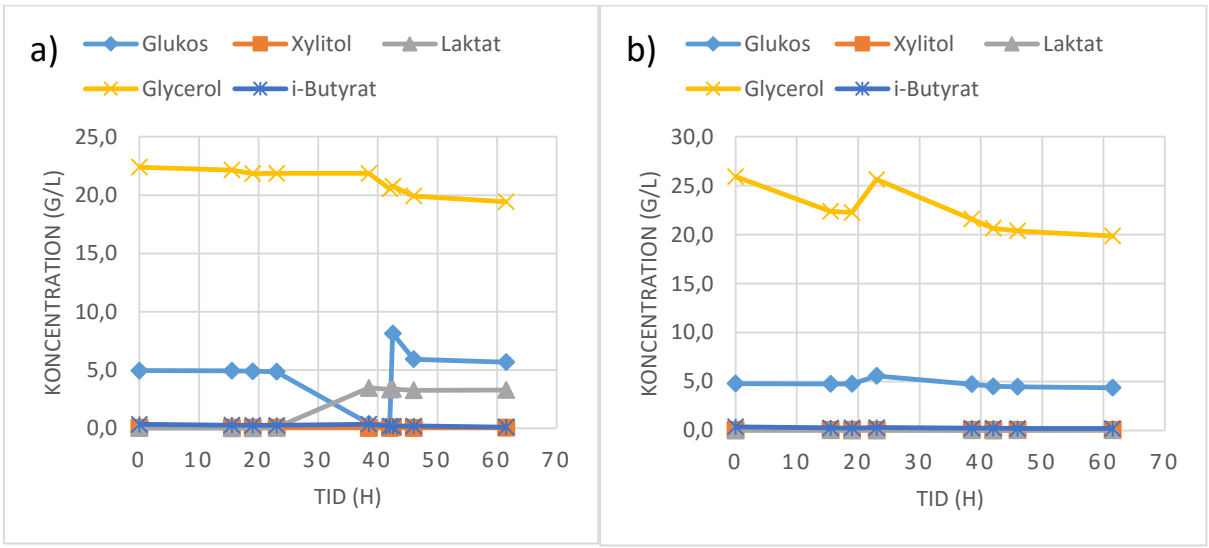
Figur A2. Producerad ström för C.acetobutylicum med glycerolavfall och LB-medium i försöksomgång 6. Skillnaden mellan biotisk reaktor och kontroll är liten trots en gradvis ökning för den tidigare efter cirka 80 h men totalt sett producerades inte mycket ström. För att förtydliga grafens utseende har en stor andel av punkterna tagits bort.

8.1.3 Koncentrationsdata

Viss laktatbildning påvisades i både biotisk arbetande katod och anod vid konsumtion av glukos (figur A3-A4).

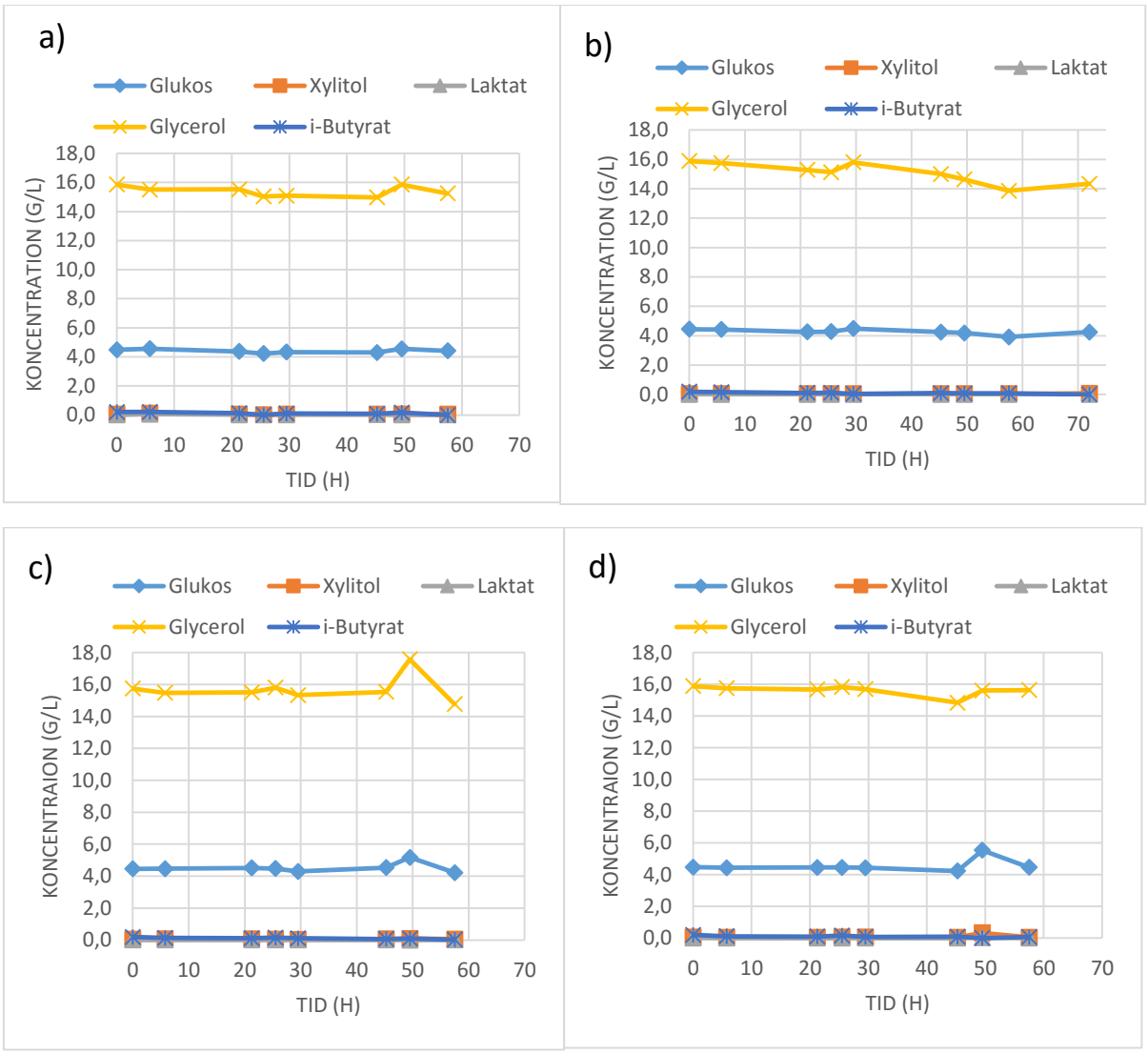


Figur A3. Koncentrationer av glukos, xylitol, laktat, glycerol och i-butyrat plottat mot tiden för försöksomgång 3. a) Biotisk arbetande katod b) abiotisk arbetande katod.

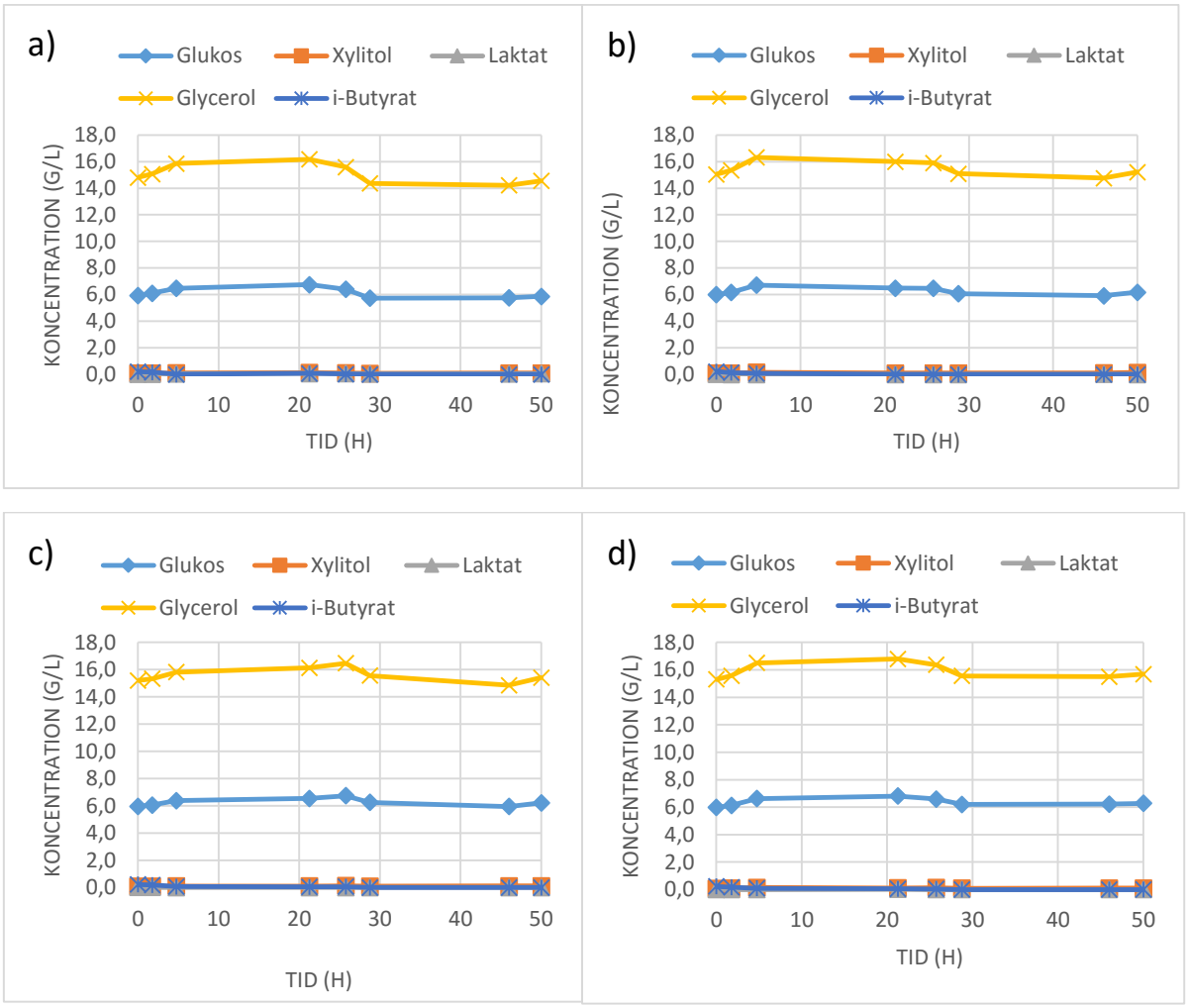


Figur A4. Koncentrationer av glukos, xylitol, laktat, glycerol och i-butyrat plottat mot tiden i försöksomgång 3. a) Biotisk arbetande anod b) abiotisk arbetande anod.

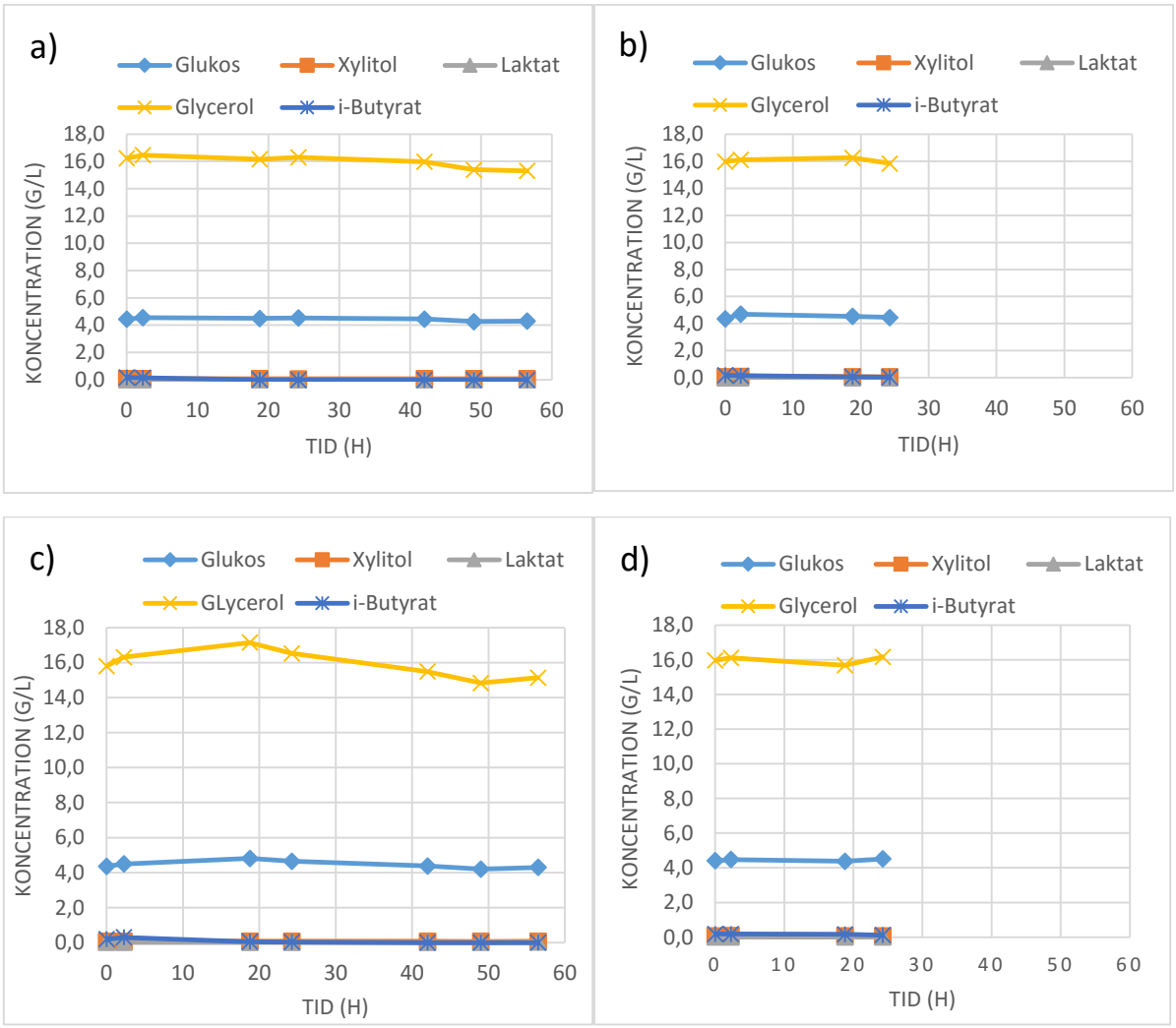
HPLC data för försöksomgång 4 till 6 påvisar ingen märkvärdig konsumtion av substrat eller produktion av någon ny produkt i någon av reaktorerna under försökens gång (figur A5-A7).



Figur A5. Koncentrationer av glukos, xylitol, laktat, glycerol, och i-butyrat plottat mot tiden för försöksomgång 4 då katoden samt anoden var inokulerad. a) Biotisk arbetande katod b) abiotisk arbetande katod c) biotisk arbetande anod d) biotisk arbetande anod.



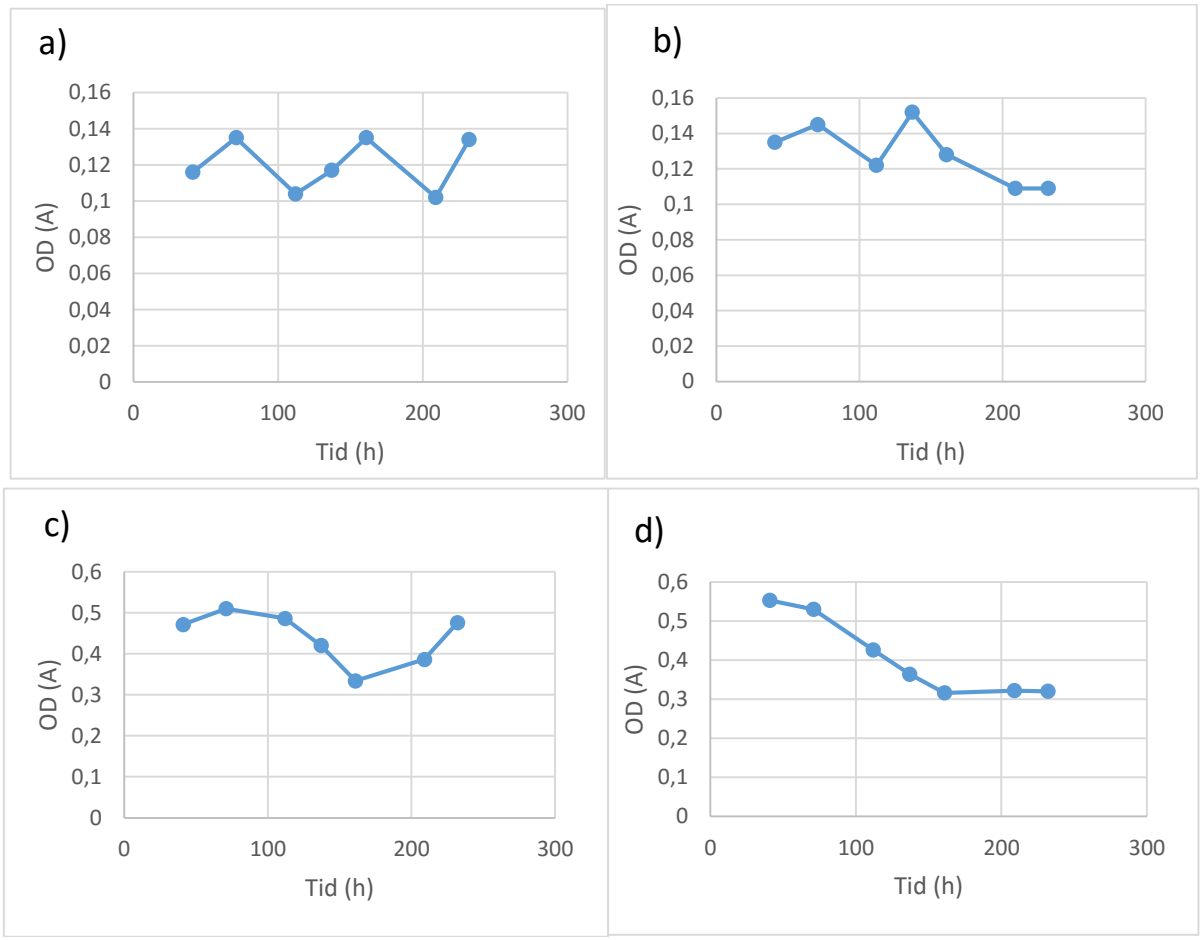
Figur A6. Koncentrationer av glukos, xylitol, laktat, glycerol, och i-butyrat plottat mot tiden för försöksomgång 5 då katoden samt anoden var inokulerad. a) Biotisk arbetande katod b) abiotisk arbetande katod c) biotisk arbetande anod d) biotisk arbetande anod.



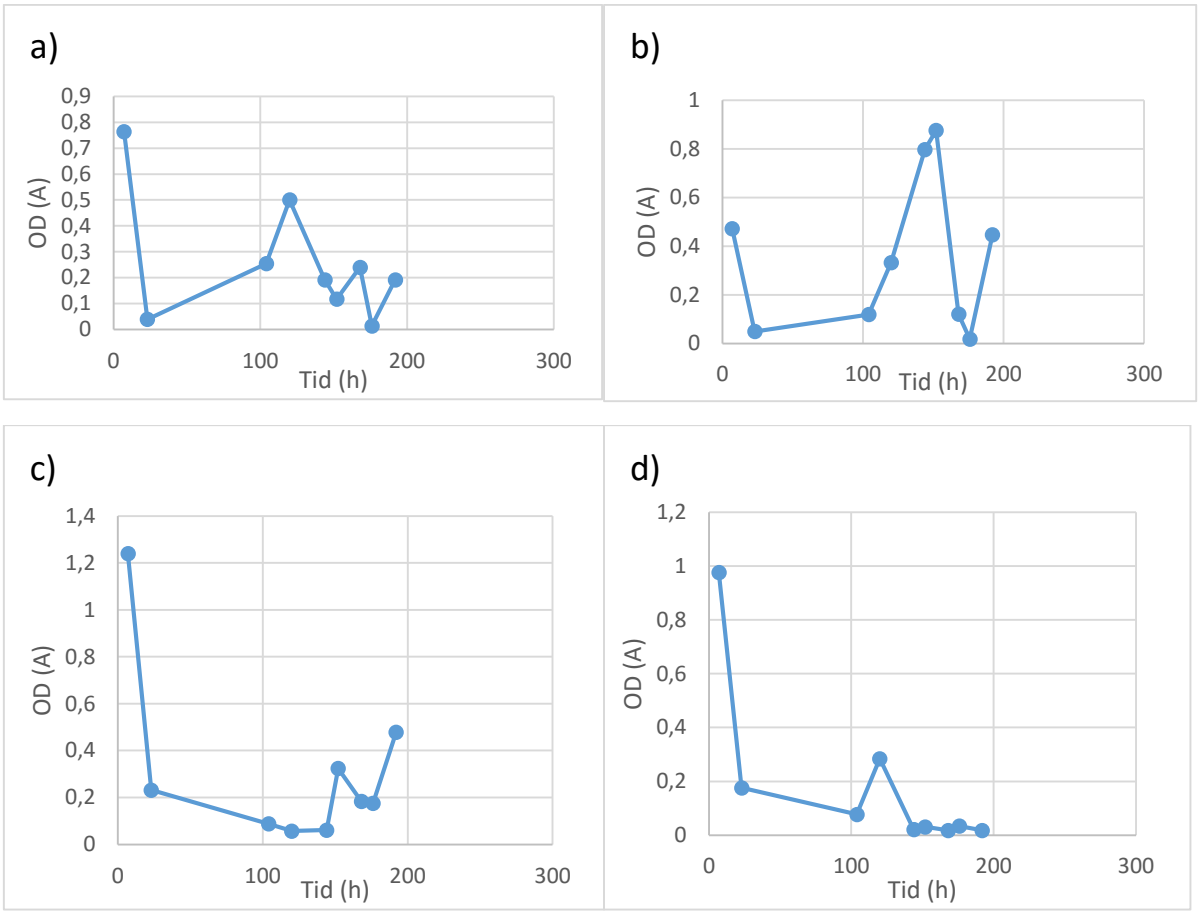
Figur A7. Koncentrationer av glukos, xylitol, laktat, glycerol, och i-butyrat plottat mot tiden för försöksomgång 6 då katoden samt anoden var inokulerad. a) Biotisk arbetande katod b) abiotisk arbetande katod c) biotisk arbetande anod d) biotisk arbetande anod.

8.1.4 Optiska densiteter

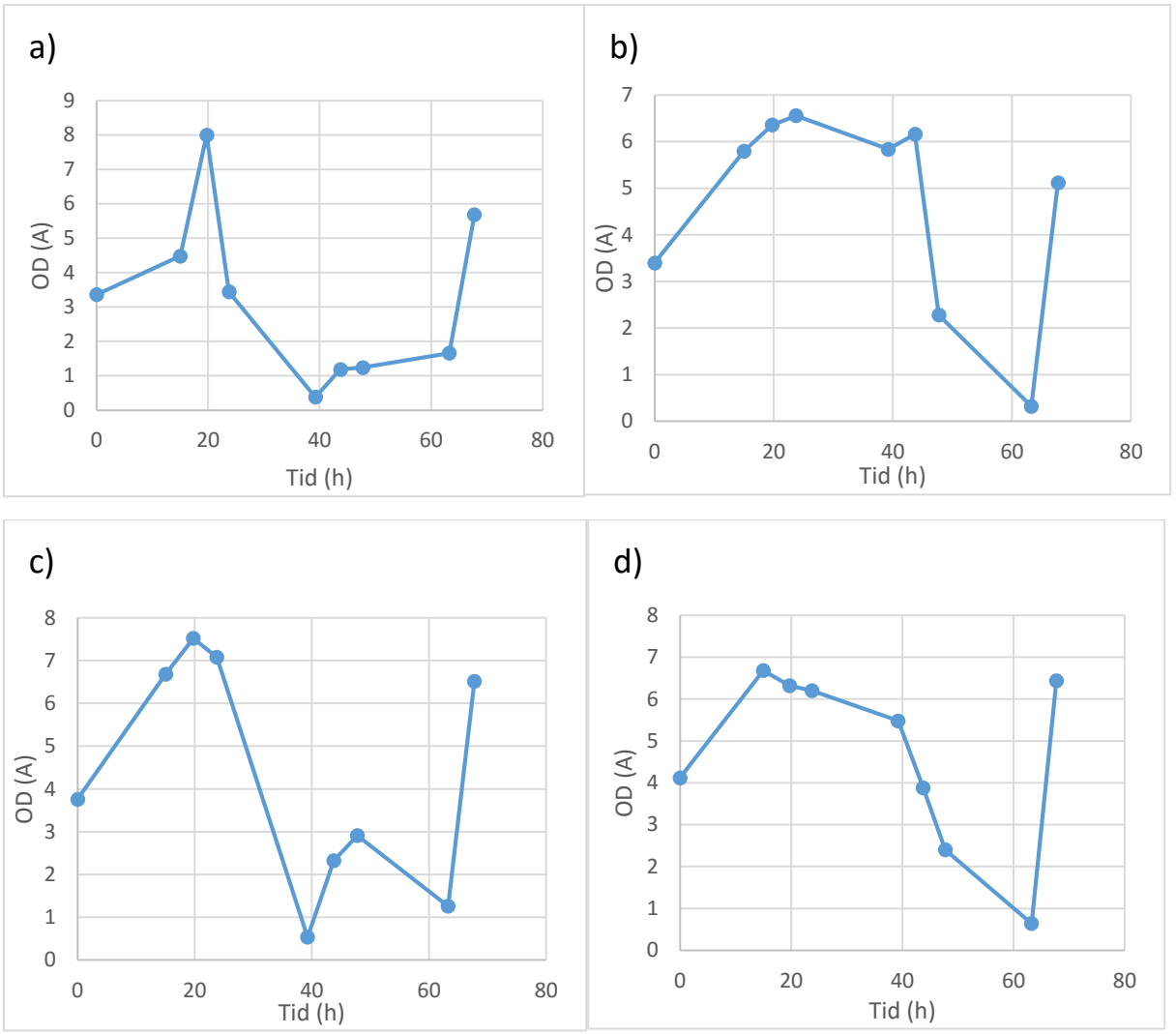
Nedan redovisas resultat för OD_{600} mot tid för försöksomgång 1-5 för alla fyra reaktorerna (figur A8-A12). Figurerna visar inte på några tydliga trender med ett undantag (figur A8 d). Följdaktligen har resultatet liten vikt och kan ej användas för att följa mikrobiell tillväxt.



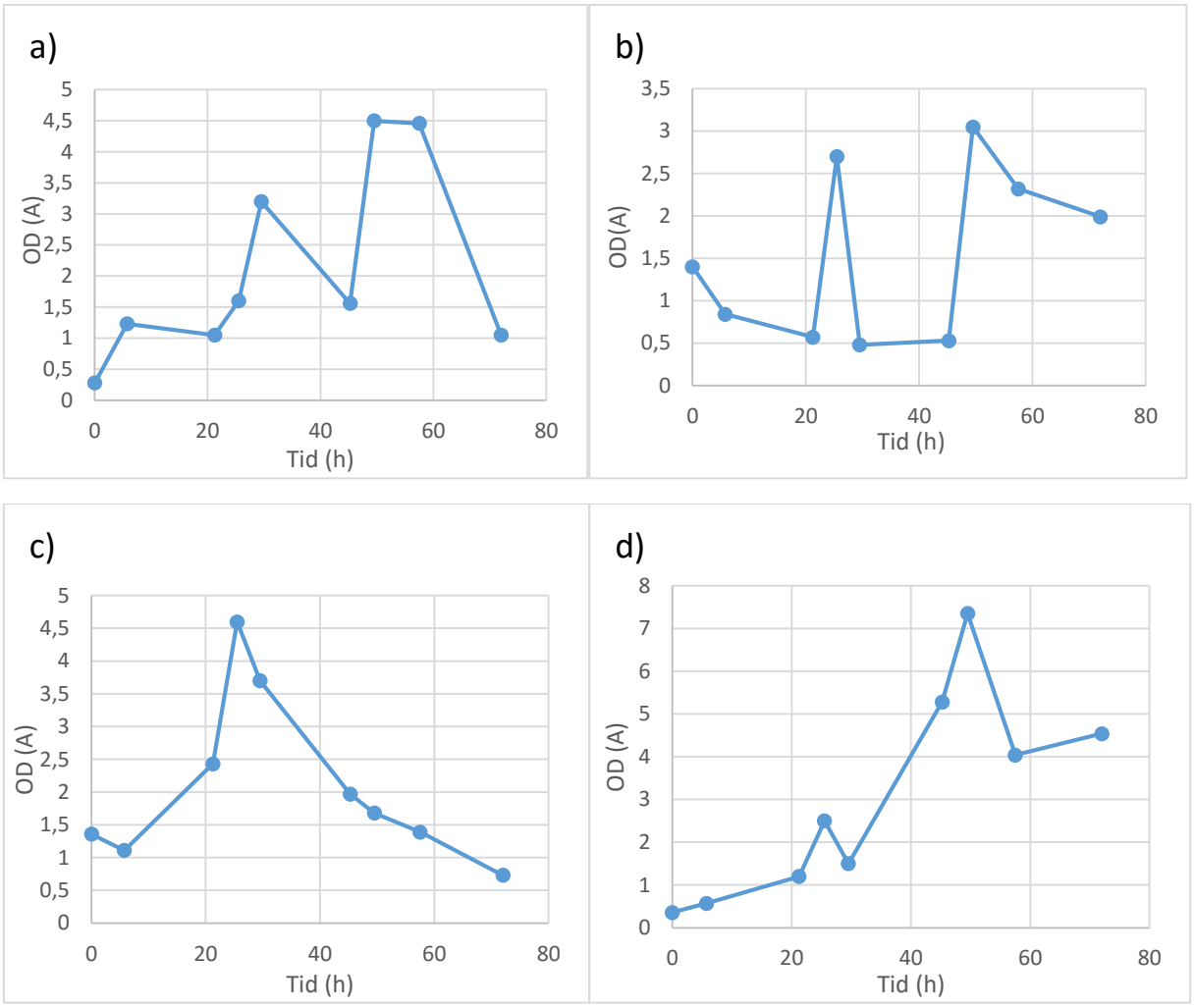
Figur A8. OD värden plottade mot tid för samtliga reaktorer under försöksomgång 1. a) Biotisk arbetande katod b) abiotisk arbetande katod c) biotisk arbetande anod d) abiotisk arbetande anod.



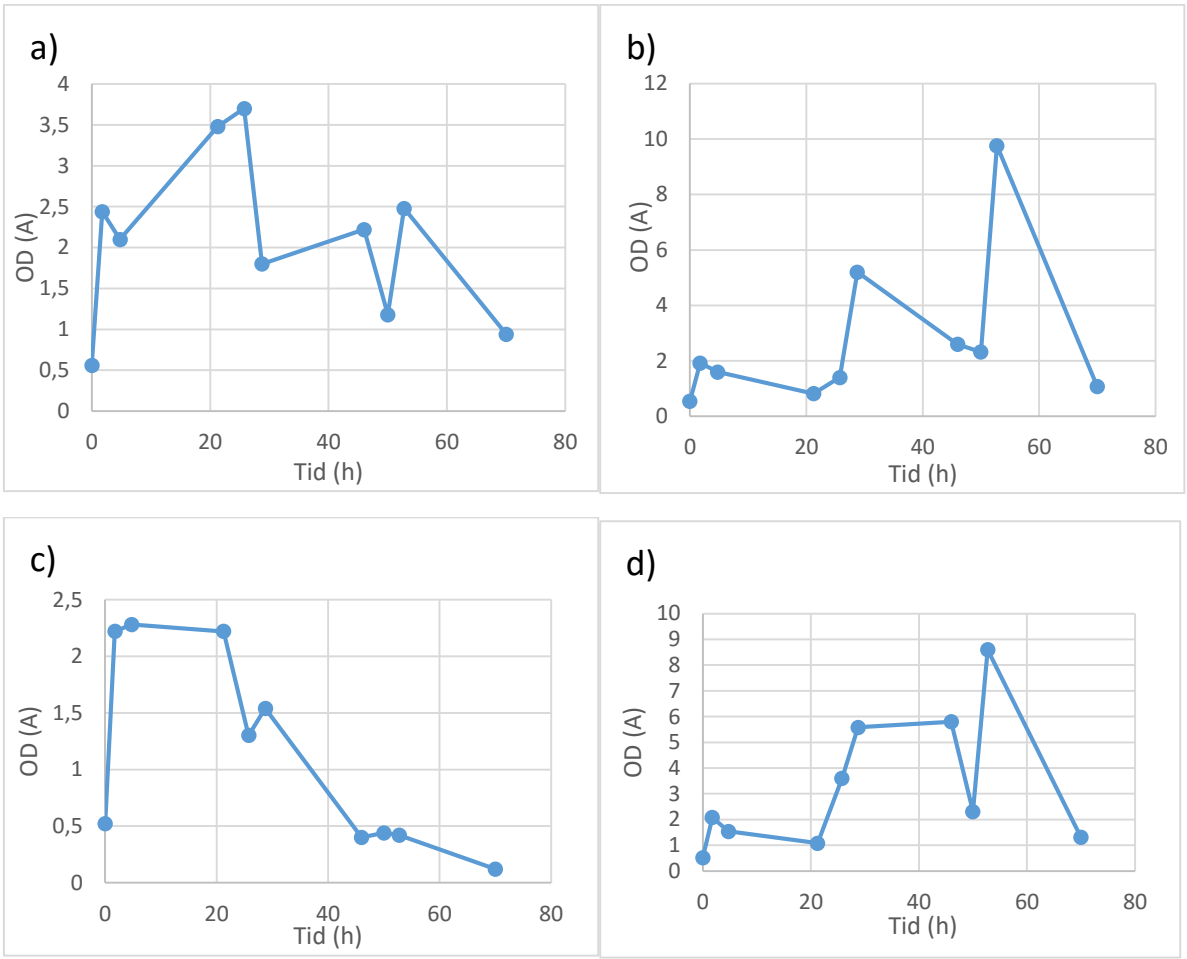
Figur A9. OD värden plottade mot tid för samtliga reaktorer under försöksomgång 2. a) Biotisk arbetande katod b) abiotisk arbetande katod c) biotisk arbetande anod d) abiotisk arbetande anod.



Figur A10. OD värden plottade mot tid för samtliga reaktorer under försöksomgång 3. a) Biotisk arbetande katod b) abiotisk arbetande katod c) biotisk arbetande anod d) abiotisk arbetande anod.



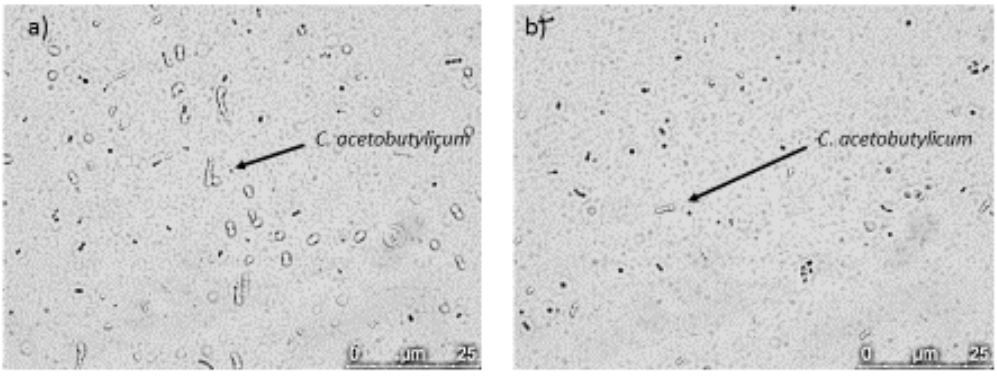
Figur A11. OD värden plottade mot tid för samtliga reaktorer under försöksomgång 4. a) Biotisk arbetande katod b) abiotisk arbetande katod c) biotisk arbetande anod d) abiotisk arbetande anod.



Figur A12. OD värden plottade mot tid för samtliga reaktorer under försöksomgång 5. a) Biotisk arbetande katod b) abiotisk arbetande katod c) biotisk arbetande anod d) abiotisk arbetande anod.

8.1.5 Mikroskopi

Ett flourescensmikroskop användes för att mikroskopera prover som togs under försöksomgång tre (figur 40). Tydliga celler observerades i reaktorerna vilket visar att *C. acetobutylicum* kan växa i det medium som användes. Arbetande katod uppvisar kraftigare tillväxt jämfört med arbetande anod vilket tyder på att *C. acetobutylicum* växer bättre under reducerande förhållanden. Detta stämmer väl överens med observerad strömproduktion (figur 17, figur 20). Det flourescensmikroskop som användes var LEICA DMI 4000 B, Leica, Tyskland. Mjukvaran som användes för att behandla bilder som togs var LAS AF, Leica, Tyskland.



Figur 40. Mikroskopbilder tagna på prover från reaktorer där C. acetobutylicum odlas med glycerolavfall och glukos som substrat. a) biotiska katodreaktorn, b) biotiska anodreaktorn.

8.2 Laborationsprotokoll

8.2.1 Preparation av buffertlösning

1 l saltlösning
- Addera 6 g NH4CL och 0,8 g MgSO4*72O till en 1 liter flaska
- Späd ut lösningen till 1 l med MQ-vatten.

0,5 l pH 7,0 fosfatbuffer
- Addera 21,40 g K2HPA4 och 10,47 KH2PO4 till en 500 ml flaska.
- Späd ut lösning till 500 ml med MQ-vatten.

0,5 l pH 5,5 fosfatbuffer
- Addera 2,958 g av K2HPO4 och 24,98 g av KH2PO4 till en 50 ml flaska.
- Späd ut lösning till 500 ml med MQ-vatten.

Stocklösning vitaminer
- Addera 2,00 mg biotin och 400 mg av p-bensoesyra till en 50 ml flaska.
- Späd ut lösning till 50 ml med MQ-vatten.

Stocklösning järnsulfat
- Addera 4,48 g FeSO4*7H2O till en 50 ml flaska.
- Späd ut lösning till 50 ml med MQ-vatten.

8.2.2 LB-medium

Lösning 1
- Mät upp 1,5 g trypton, 3 g jästextrakt, 1,5 g bacto peptone och 150 µl resazurin i en flaska.
- Späd med MQ-water till en total volym på 200 ml.
- Addera 0,15 g ~~av~~ L-cystein i 10 ml MQ-vatten, addera sedan detta till den första lösningen.
- För över till serumflaska (lufttäta flaskor) och ventilera med kvävgasflöde.
- Autoklavera när vätskans färg skiftat från rosa till gult.

Glukoslösning
- Blanda 10 ml MQ-water och 0,15 g glukos.
- Filtrera ner lösningen med ett 0,2 µl nylonfilter i en autoklaverad serumflaska.
- Ventilera med kvävgas.

Saltlösning 1
- Lös upp 0,1 g K_2HPO_4 och 0,1 g KH_2PO_4 i 20 ml MQ H2O.

Saltlösning 2
- Lös upp $MgSO_4$ x $7H_2O$, 25 mg $CaCl_2$ x $2H_2O$, 1 g $NaHCO_3$ och 0,2 g NaCl i 20 ml MQ-vatten.
- Autoklavera båda saltlösningar och blanda sedan i serumflaska. ventilera serumflaskan med kvävgas.

Sista steget

Addera samtliga lösningar till första serumflaskan. Kontrollera att pH-värdet är mellan 6,8 och 7.0, justera det annars. Totala volymen ska nu vara 300 ml. Ventilera med kvävgas en sista gång.

8.2.3 Minimum yeast medium för *S. cerevisiae*
- Blanda 15 g $(NH_4)_2SO_4$, 7 g KH_2PO_4, 1,5 g $MgSO_4$*$7H_2O$ och späd med vatten till slutvolym 1 l i ett 2 l kärl.
- Späd 44 g glukos*H_2O i vatten till slutvolym 1 l i ett separat kärl 2 l kärl.

- Autoklavera lösningarna.
- Blanda lösningarna och addera 2 ml/l spårmetaller samt 1 ml/l vitaminer (34)

8.2.4 Intermediate medium

Lösning A bestående av två delar

- Del A (1 g/l K_2HPO_4; 1 g/l KH_2PO_4) och del B (0,5 g/l $MgSO_4$*7 H_2O; 0,25 g/l $CaCl_2$*2 H_2O; 10 g/l $NaHCO_3$; 2 g/l NaCl)
- Justera till pH 7 för båda delarna och autoklavera dem separat.

Lösning B

- Lös 5 g/l trypton, 10 g/l jäst extrakt, 5 g/l bacto pepton och 1 ml 0,1 (w/v) resazurin i destillerat vatten.
- Ventilera med 100 % N_2(g) under 45 min för att skapa syrefrimiljö.
- Addera L-cysteine-HCl*H_2O och justera till pH 7.
- Ventilera med 100 % N_2(g) tills lösningens färg byter färg från brun/lila till gul.
- Autoklavera och addera därefter 5 g/l sterilfiltrerad D-glukos samt 40 ml av lösning A.

8.2.5 Odling av jäst för SSF

- Önskvärd OD_{600} för uppodling av startkulturer till SSF var 0,075. Förodlad jästkultur i 50 ml eppendorfrör tillhandahölls av David Moreno. OD_{600} för denna mättes till 2,68.
- 200 ml minimum yeast medium (appendix 8.2.3) tillsattes i 12 st E-kolvar med bomullsproppar.
- 560 µl förodlad jäst tillsattes varje kolv för att erhålla $OD_{600} \approx 0{,}075$ enligt:
  $V(\text{startkultur}) = V(\text{förodling}) * OD_{600}(\text{förodling}) / OD_{600}(\text{startkultur})$
  $= 0{,}200 * 0{,}075 / 2{,}68 \approx 560 \mu l$
- Kolvarna placerades på skakbord med 180 rpm vid 30°C.
- Efter 17 h mättes OD_{600} för kulturerna, mätningarna varierade mellan 2,54 och 3,76.
- Kulturerna kombinerades tre och tre för att få fyra kolvar totalt. Dessa centrifugerades och cellpellets suspenderades i 4 ml vatten för inokulering.

8.2.6 Odling av bakteriekultur för BES

C. acetobutylicum beställdes som frystorkade kulturer i ampuller från DSMZ.

- Ampullerna öppnades under 100 % N_2-atmosfär genom användning av Aldrich® AtmosBag (Sigma Aldrich, Tyskland). Isolerande material och bomullsproppar avlägsnades med sterila pincetter.
- Kulturerna blandades i mjölkmedium bestående av 1 ml resazurin löst i 1 l 3,5 % färsk mjölk.
- Blandade kulturer flyttades till 50 ml serumflaskor innehållande 25 ml mjölkmedium och N2-atmosfär under sterila och syrefria förhållanden.
- Serumflaskorna inkuberades vid 37°C under 1 dag.
- 1 ml mjölkmedium innehållandes celler överfördes till de syrefria serumflaskorna innehållande inermediate medium (appendix 8.2.4) där lösta gaser avlägsnats. *C. acetobutylicum* förvarades i intermediate medium, så kallad "stock solution", vid 4°C för framtida användning.

- 1 ml "stock solution" användes för att inokulera serumflaskor innehållande syrefri och steril intermediate medium som förkulturer.

- Förkulturer inkuberades vid 37°C under 24 h.

- De arbetande kamrarna (tabell 1) inokulerades med 1 ml förkultur var.

S. oneidensis

- Förkultur gjordes genom att 5 µl kryogen *S. oneidensis* i glycerol överfördes under sterila förhållanden till en E-kolv innehållande 200 ml LB-medium (appendix 8.2.2).

- Kolvarna inkuberades vid 30°C och 180 rpm under anaeroba förhållanden i 2 dagar.

- Varje arbetande kammare inokulerades med 1 ml förkultur

8.2.7 Provtagning

Observera reaktorerna och se om:
- Ventilering är ok
- Potential är ok
- Vattennivå är ok
- Färgen på reaktorerna

Om ventileringen inte fungerar: inspektera slangar eller gasuttag.
Om potentialen inte är ok: Kolla om elektroderna är ok, de kan brytas ned på grund av pH nivån. Vattennivån kan även vara en källa till abnormal potential.
Om vattennivån är låg: Injicera O2 fritt vatten efter behov.
Provtagning
- Förbered fyra sterila nålar under laf bänken.
- Rengör reaktoröppningarna med en pappersbit som har tvättats med 70 % etanol.
- Extrahera 1 ml av prov från varje reaktor till märkta 2 ml eppendorftuber.
- Notera tiden som proverna togs.

pH-justering
- Avläs pH för varje prov med pH meter. Rengör pH metern med destillerat vatten mellan proverna.
- Om pH är för högt eller för lågt: Rengör reaktoröppningarna med en pappersbit som har tvättats med 70 % etanol. Injicera 2M filtrerad (0,2 µm) HCl eller 2M filtrerad (0,2 µm) NaOH utefter behöv beroende om pH är för högt eller för lågt. För högt: använd syra, för lågt: använd bas.
- Ta nya prover och avläs pH.
- Notera pH och mängd tillsatt syra eller bas för varje pH test.

OD test
- Se till att våglängden på spektrofotometern är inställd till 600 nm.
- Späd ut proverna med MQ vatten efter behov. Se tidigare OD-mätningar för utspädninsvägledning. Utspädningen måste resultera att att proverna håller sig inom intervallet (0,003;0,3).
- Sätt en blank med distillerat vatten.
- Mät OD för samtliga prover.

Förberedelser för HPLC
- Späd ut samtliga prover 3 gånger.
- Centrifugera proverna vid 21,1*1000 g under 5 minuters tid.
- Filtrera sedan proverna genom 0,2 µm filter till nya märkta 2 ml epepndorfrör.
- Extrahera 550 µl av de filtrerade proverna från eppendorfrören och addera dem i HPLC vialer.
- Placera vialerna HPLC (Dionex® Ultimate 3000, Dionex Corp., USA). HPLC kolumn som används: Rezex™ ROA-Organic Acids H+ column (8%; 300 mm × 7.8 mm), Phenomenex Inc., Danmark.

- Lägg till proverna i HPLC sekvensen i datorn kopplad till HPLC.

8.2.8 Rengöring och förberedelse av reaktorer

Förberedelse

- Följande utrustning behöver autoklaveras:
- Fyra 1 l flaskor
- Mätningscylinder med minst 350 ml volym.
- Minst 700 ml MQ vatten.
- 1000 µL pipettippar.

Använd handskar. Spraya händer, alla flaskor, och all utrustnig med 70 % etanol innan det placeras i dragskåp.

- Töm de autoklaverade reaktorerna från vatten. Greppa alltid båda sidorna av reaktorn vid tömning.
- Fyll reaktorer enligt den försöksuppsättning som gäller.
- Ta bort använda flaskor från labbänken då de inte används längre. Rengör mätglaset med MQ vatten mellan användningar alternativt se till att det finns flera autoklaverade mätcylindrar.
- Skruva på locken ordentligt och sätt på filter för utgående gas samt referenselektrod. Referenselektroden behöver steriliseras med 70 % etanol, viktigt att ge etanolen tid att evaporera från referenselektroden.
- Förflytta reaktorer med båda händerna från labbänken till de magnetomrörarna och sätt på dom.
- Sätt i gasnålar och justera gasflöden.
- Koppla potentiostatkablar. Svart: arbetande elektroder. Grön: referenselektrod. Gul: Icke arbetande elektrod. Viktigt att se till att de inte rör vid någon annan metallyta.
- Sätt på den första potentiostatenheten, de andra är sammankopplade med den första.
- Starta ett nytt projekt i MLAB för varje reaktor. När du trycker på start så borde potentiostaterna göra ett klickande ljud.
- Ta prover och justera pH vid behov.

Rengöring

- Ta försiktigt bort refrenselektrod, rengör med 70 % etanol, och placera i 3 M NaCl lösning
- Ta bort gummipluggar och rengör dem med 70 % etanol. Skruva upp locken på reaktorerna och ta bort elektroder, använd tång vid behov. De arbetande elektroder som inte har skadats kan användas som icke arbetande elektroder under nästkommande körning. Annars kan de slängas tillsammans med andra icke arbetande elektroder.
- Häll ner all vätska från samtliga reaktorer i en större behållare. Detta slängs som ‘’bio waste’’. Vidta extra försiktighet vid hantering av reaktorera på sätta vis, greppa alltid båda sidorna av reaktorn så att mittendelen inte går sönder. Rengör omrörare under rinnande vatten och lägg tillbaka i reaktorn.
- Spraya insida och utsida av reaktor med 70 % etanol och häll ut i ‘’bio waste’’. Skölj sedan med vatten.
- Ersätt de elektroder som har slängts. Byt nålingång på reaktorerna. Fyll reaktorer med vatten och återplacera lock, elektroder och gummipluggar.
- Limma fast utbytta elektroder med ‘’epoxy universal glue’’ och låt torka under en timma. Använd skyddshanskar på limmet kan orsaka allergier.
- Försegal öppningar med aluminiumfolie.
- Autoklavera reaktorer tillsammans med slangar. Se till att den öppna delen av filtret på slangen är förseglat med aluminiumfolie.

8.2.9 Glycerolavfall datablad

Innehållsförteckning av glycerolavfall utvunnen från 100% rapsolja i RME producktionsprocessen från Ecobränsle (tabell 3).

Tabell 2. Innehållsförteckning på glycerolavfall från Ecobränsle i Karlshamn AB, Karlshamn, Sverige.

Parameter	**Typical analytical data***	**Enhet**
Aluminium (as Al_2O_3)	< 0,01	% (m/m)
Barium (as BaO)	< 0,01	% (m/m)
Calcium (as CaO)	0,12	% (m/m)
Iron (as Fe_2O_3)	< 0,01	% (m/m)
Potassium (as K_2O)	96,2	% (m/m)
Magnesium (as MgO)	< 0,01	% (m/m)
Manganese (as MnO)	< 0,01	% (m/m)
Sodium (as Na_2O)	0,28	% (m/m)
Phosphorus (as P_2O_5)	0,05	% (m/m)
Silicon (as SiO_2)	3,20	% (m/m)
Sulfur (as SO_3)	0,10	% (m/m)
Strontium (as SrO)	< 0,01	% (m/m)
Titanium (as TiO_2)	< 0,01	% (m/m)
Chloride content	< 10 (2)	mg/kg
Formiate content	< 10	mg/kg
Acetate content	< 10	mg/kg
Kin. viscosity (40°C)	624	mm^2/s
Dyn. viscosity (40°C)	732	mPa s
Methanol content	< 4	% (m/m)
Water content	< 2	% (m/m)
Glycerol content	> 75	% (m/m)
Ash content (750°C)	< 8	% (m/m)
MONG	< 20	% (m/m)
Flash point	65 < °C < 80	°C
pH value	12	-

Density	1 150	kg/m³

8.3 Matlab skript

Här presenteras den matlabkod som användes för hantering av erhållen data, bearbetning krävdes då det generellt förekom en stor mängd ströpunkter.

```
%% data modifiering kandidatarbetet
% Save the data as [t(s) t(h) I(mA) AUX(mV) U(mV)] in the excel file. Put
% the file in the same folder as this program and if you are going to
% plot one curve specify the file name at line 20. Choose title at line 100
% and the name of the curve at line 101.
%
% If you want to plot 2 curves in the same graph specify file names at
% line 23 (inoculated)and line 24 (control). Choose title at line 207 and
% legend at line 208. Press Run and answer the questions.


clc
clear all
clf

X=input('What do you want on the x-axle? 1:5 :');
Y=input('What do you want on the y-axle? 1:5 :');
v=input('How many curves do you want to plot? 1 or 2 :');
if v==1
D=xlsread('Data1.XLS');
tolD=input('Choose your tolerance of sample curve :');
else if v==2
A=xlsread('Data1.XLS');
D=xlsread('Data2.XLS');
tolA=input('Choose your tolerance of biotic sample curve :');
tolD=input('Choose your tolerance of abiotic sample curve :');
    else
        fprintf(2,'Error only one or two curves per graph ')
        break
    end
end

kD=length(D);
PD(:,1:5)=D;
PD(:,6)=0;
PD(1,6)=2;
PD(kD,6)=2;
meanPD=mean(PD);
for i=2:length(D)-1
    if X==2
        if abs(PD(i,5)-meanPD(1,5))>1000
        PD(i,6)=2;
        end
    end
    if i==2
        if abs(PD(i,Y)-PD(i+1,Y))>tolD
            PD(i,6)=2;
        end
    else if i==length(D)-2
            if abs(PD(i,Y)-PD(i-1,Y))>tolD
                PD(i,6)=2;
```

```
            end
    else
         if abs(PD(i,Y)-PD(i-1,Y))>tolD
                PD(i,6)=1;
         end
         if PD(i,6)==1
                if abs(PD(i,Y)-PD(i+1,Y))>tolD
                    PD(i,6)=2;
                end
         end
        end
    end
end
if X==5
    for i=2:length(D)-1
    if i==2
        if abs(PD(i,X)-PD(i+1,X))>2
            PD(i,6)=2;
        end
    else if i==length(D)-2
            if abs(PD(i,X)-PD(i-1))>2
                PD(i,6)=2;
            end
    else
         if abs(PD(i,X)-PD(i-1,X))>2
                PD(i,6)=1;
         end
         if PD(i,6)==1
                if abs(PD(i,X)-PD(i+1,X))>2
                    PD(i,6)=2;
                end
         end
        end
    end
    end
end

RD=PD;
TF1D=RD(:,6)==2;
RD(TF1D,:)=[];
maxPD=max(PD);
minPD=min(PD);
if v==1
    Xmin=min(RD(:,X))-abs((max(RD(:,X))-
min(RD(:,X)))/length(RD))*length(RD)*.02;
    Xmax=max(RD(:,X))+abs((max(RD(:,X))-
min(RD(:,X)))/length(RD))*length(RD)*.02;
    Ymin=min(RD(:,Y))-abs((max(RD(:,Y))-
min(RD(:,Y)))/length(RD))*length(RD)*.02;
    Ymax=max(RD(:,Y))+abs((max(RD(:,Y))-
min(RD(:,Y)))/length(RD))*length(RD)*.02;
    plot(RD(:,X),RD(:,Y),'.')
    axis([Xmin Xmax Ymin Ymax])
    title('Title1')
    legend('Title2')
    E=(1-length(RD)/length(PD))*100;
    disp('Data removed (%)')
    disp(E)
    if X==2
        I=meanPD(1,3);
        t=maxPD(1,2)-minPD(1,2);
```

```
        Q=I*t*3.6;
        disp('Total amount of charge created (C)')
        disp(Q)
    end
end

if v==2
kA=length(A);
PA(:,1:5)=A;
PA(:,6)=0;
PA(1,6)=2;
PA(kA,6)=2;
meanPA=mean(PA);
if X==5
    for i=2:length(A)-1
    if i==2
        if abs(PA(i,X)-PA(i+1,X))>2
            PA(i,6)=2;
        end
    else if i==length(A)-2
            if abs(PA(i,X)-PA(i-1))>2
                PA(i,6)=2;
            end
    else
         if abs(PA(i,X)-PA(i-1,X))>2
                PA(i,6)=1;
         end
         if PA(i,6)==1
                if abs(PA(i,X)-PA(i+1,X))>2
                    PA(i,6)=2;
                end
         end
        end
    end
    end
end
for i=2:length(A)-1
    if X==2
        if abs(PA(i,5)-meanPA(1,5))>1000
        PA(i,6)=2;
        end
    end
    if i==2
        if abs(PA(i,Y)-PA(i+1,Y))>tolA
            PA(i,6)=2;
        end
    else if i==length(A)-2
            if abs(PA(i,Y)-PA(i-1))>tolA
                PA(i,6)=2;
            end
    else
         if abs(PA(i,Y)-PA(i-1,Y))>tolA
                PA(i,6)=1;
         end
         if PA(i,6)==1
                if abs(PA(i,Y)-PA(i+1,Y))>tolA
                    PA(i,6)=2;
                end
         end
        end
    end
```

```
end
RA=PA;
TF1A=RA(:,6)==2;
RA(TF1A,:)=[];
ED=(1-length(RD)/length(PD))*100;
EA=(1-length(RA)/length(PA))*100;
disp('Data removed, abiotic reactor (%)')
disp(ED)
disp('Data removed, biotic reactor (%)')
disp(EA)

if min(RD(:,X))<min(RA(:,X))
    Xmin=min(RD(:,X))-abs((max(RD(:,X))-
min(RD(:,X)))/length(RD))*length(RD)*.02;
else
    Xmin=min(RA(:,X))-abs((max(RA(:,X))-
min(RA(:,X)))/length(RA))*length(RA)*.02;
end

if max(RD(:,X))>max(RA(:,X))
    Xmax=max(RD(:,X))+abs((max(RD(:,X))-
min(RD(:,X)))/length(RD))*length(RD)*.02;
else
    Xmax=max(RA(:,X))+abs((max(RA(:,X))-
min(RA(:,X)))/length(RA))*length(RA)*.02;
end

if min(RD(:,Y))<min(RA(:,Y))
    Ymin=min(RD(:,Y))-abs((max(RD(:,Y))-
min(RD(:,Y)))/length(RD))*length(RD)*.02;
else
    Ymin=min(RA(:,Y))-abs((max(RA(:,Y))-
min(RA(:,Y)))/length(RA))*length(RA)*.02;
end

if max(RD(:,Y))>max(RA(:,Y))
    Ymax=max(RD(:,Y))+abs((max(RD(:,Y))-
min(RD(:,Y)))/length(RD))*length(RD)*.02;
else
    Ymax=max(RA(:,Y))+abs((max(RA(:,Y))-
min(RA(:,Y)))/length(RA))*length(RA)*.02;
end
plot(RA(:,X),RA(:,Y),'-k',RD(:,X),RD(:,Y),'--b')
axis([Xmin Xmax Ymin Ymax])
title('Titel1')
legend('biotisk','abiotisk') % First one is biotic one and second is
abiotic
maxPA=max(PA);
minPA=min(PA);
if X==2
        IA=meanPA(1,3);
        disp('Mean current, biotic');
        disp(IA);
        tA=maxPA(1,2)-minPA(1,2);
        QA=IA*tA*3.6;
        disp('Total amount of charge created by biotic sample (C)')
        disp(QA)
        ID=meanPD(1,3);
        disp('Mean current, abiotic');
        disp(ID);
        tD=maxPD(1,2)-minPD(1,2);
```

```
        QD=ID*tD*3.6;
        disp('Total amount of charges created by abiotic sample (C)')
        disp(QD)
end
end

if X==5
    xlabel('Potential (mV)')
else if X==2
        xlabel('Ström (mA)')
    end
end
ylabel('Ström (mA)')
grid on
```

8.4 Felkällor

De bitvis motsägelsefulla resultaten skulle kunna förklaras av att sju olika personer tog och analyserade de prover som togs under experimentens gång. Detta kan ha lett till stor individuell variation mellan hur proverna blir även om en standardiserad procedur följs. Som alla experiment inom biotekniska områden så är sterilteknik en viktig komponent av det laborativa arbetet. Om god sterilteknik inte utövas så finns risk för kontamination. En annan potentiell felkälla vid laborativt arbete är pipettering samt utspädning. En felberäkning vid utspädning av en lösning kan leda till avvikande resultat.

Det togs ut några milliliter vätska ur reaktorerna vid varje provtagning för mätning av OD, koncentrationer och pH-värde. Då det enbart tillsattes små mängder med syra eller bas för pH-justering eller MQ vatten för vätskenivåjustering minskade den totala koncentrationen i g/l av andra ämnen. Detta betyder att om en koncentration minskar över tiden behöver det inte nödvändigtvis betyda att den konsumeras.