

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

ŪDENRAŽA MIKROBIOLOĢISKA PRODUCĒŠANA,
IZMANTOJOT *ENTEROBACTER AEROGENES*, UN
UZKRĀŠANA AB₅ TIPA SAKAUSĒJUMĀ

Bakalaura darbs

Autors: Matīss Paiders

Stud. apl. Nr. mp14028

Darba vadītājs: Dr. biol., asoc. prof. Vizma Nikolajeva

RĪGA 2017

SATURS

Ievads	5
1. Literatūras apskats.....	6
1.1. Ūdeņradis un tā iegūšana	6
1.2. Bioūdeņradis	6
1.3. Darbā izmantoto baktēriju raksturojums	8
1.4. Ūdeņraža uzglabāšanas metodes	10
2. Materiāli un metodes.....	13
2.1. Izmantotās iekārtas un piederumi.....	13
2.2. Izmantotās baktērijas.....	15
2.3. Baktēriju kultivēšana anaerobos apstākļos.....	15
2.4. Gāzu analīzes	17
2.5. Hromatogrāfija	18
2.6. Termogravimetrija.....	18
2.7. Datu statistiskā apstrāde	18
3. Rezultāti un diskusija	19
3.1. Barotņu gāzes fāzes masspektrometriskā analīze	19
3.2. Izdalītās gāzes tilpums	23
3.3. Baktēriju daudzums barotnēs	25
3.4. Barotņu hromatogrāfiskā analīze	27
3.5. Termogravimetrija.....	29
4. Secinājumi.....	35
5. Pateicības.....	36
6. Literatūras saraksts.....	37

KOPSAVILKUMS

Ūdeņradis ir atjaunojams un tīrs enerģijas nesējs, kuru var iegūt mikrobioloģiski fermentējot glicerīnu.

Šī darba mērķis bija pētīt *Enterobacter aerogenes* spēju producēt ūdeņradi, fermentējot glicerīnu, kā arī hidrīdu veidojošu AB₅ sakausējumu spēju uzkrāt ūdeņradi, tiem atrodoties barotnē ar baktērijām.

Barotņu gāzes fāzes sastāvu noteica ar masspektrometru un pārlicinājās par *Enterobacter aerogenes* spēju producēt ūdeņradi, fermentējot glicerīnu. Tika aprēķināts ūdeņraža produkcijas iznākums 0,15 moli H₂ uz molu glicerīna. Konstatēja LaNi₅ sakausējuma pulvera inhibējošo ietekmi uz *Enterobacter aerogenes* gāzu produkciju. Jaukta sastāva AB₅ pulveris gāzu produkciju palielināja.

Nosakot LaNi₅ sakausējuma masas zudumu ar termogravimetrijas metodi, ūdeņraža saistīšanās metāla hidrīdu veidā netika pārliecinoši konstatēta.

Bioūdeņradis, ūdeņradi producējošas baktērijas, *Enterobacter aerogenes*, glicerīns, metālhidrīdi.

SUMMARY

Microbial hydrogen production using *Enterobacter aerogenes* and its storage in AB₅ type alloy

Hydrogen is a renewable and clean energy carrier, that can be produced microbiologically by fermentation of glycerol.

The aim of this research was to study *Enterobacter aerogenes* capabilities of producing hydrogen by fermentation of glycerol and to study hydrogen storage possibilities of hydride forming AB₅ type alloys by placing them in the medium with bacteria.

Amount of hydrogen in the gas phase sample of growth media was determined with mass spectrometer and the results verified *Enterobacter aerogenes* hydrogen production abilities by fermentation of glycerol. Yield of 0.15 mol H₂/mol glycerol was calculated. LaNi₅ alloy powder showed inhibitory effect on *Enterobacter aerogenes* gas production. The presence of multicomponent AB₅ alloy powder increased gas production.

By determining the mass loss of LaNi₅ alloy with thermogravimetry no convincing results on metal hydride formation were made.

Biohydrogen, hydrogen producing bacteria, *Enterobacter aerogenes*, glycerol, metal hydrides.

IEVADS

Fosilo kurināmo lielo izmantošanas apjomu dēļ tiek plaši pētīti alternatīvi enerģijas iegūšanas veidi. Viens no tiem ir ūdeņraža producēšana no biomasas. Ūdeņradis tiek uzskatīts par ļoti tīru enerģijas nesēju, jo tā degšanas procesā kā vienīgais reakcijas produkts veidojas ūdens. Nozīmīgi, ka ūdeņradis var tikt producēts, mikroorganismiem fermentējot notekūdeņus un rūpniecības atkritumproduktus (Cardoso et al. 2014). Ūdeņradi var arī iegūt fermentējot jēlglicerīnu – biodīzeļa ražošanas atkritumproduktu, kas ir svarīgi, jo biodīzeļa ražošanas apjomi pasaulē ievērojami pieaug (Yang et al. 2012) un jēlglicerīna uzkrāšana lielos daudzumos var radīt draudus videi (Garlapati et al. 2016).

Liela nozīme ir arī ūdeņraža uzglabāšanas pētījumiem. Ūdeņraža uzglabāšana augsta spiediena gāzes vai sašķidrinātā veidā ne vienmēr ir labākais risinājums dārgo izmaksu un potenciālu noplūžu dēļ. Lai nodrošinātu nākotnes prasībām atbilstošu ūdeņraža transportu un uzglabāšanu, tiek aktīvi pētīta ūdeņraža uzkrāšana metāla hidrīdu veidā (Sakintuna et al. 2006).

Darba mērķis: pētīt *Enterobacter aerogenes* spēju producēt ūdeņradi, fermentējot glicerīnu, kā arī hidrīdu veidojošu AB₅ sakausējumu spēju uzkrāt ūdeņradi, tiem atrodoties barotnē ar baktērijām. Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti uzdevumi:

- 1) salīdzināt ūdeņraža produkciju, kultivējot *Enterobacter aerogenes* anaerobos apstākļos barotnēs ar glicerīnu un bez glicerīna;
- 2) pārbaudīt hidrīdus veidojošo AB₅ sakausējumu spēju uzkrāt ūdeņradi, to pievienojot barotnēm ar glicerīnu, kurās kultivēts *Enterobacter aerogenes*, un salīdzināt to ar kontroles barotnēm bez *Enterobacter aerogenes*;
- 3) noteikt gāzu sastāvu barotņu gāzes fāzē ar masspektrometrijas metodi;
- 4) veikt barotņu sastāva analīzi ar šķidrums hromatogrāfijas metodi;
- 5) noteikt metālhidrīdos uzkrātā ūdeņraža daudzumu ar termogravimetrijas metodi.

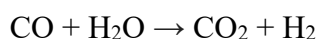
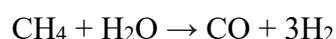
Darbs tika izstrādāts Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā, Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā un Cietvielu fizikas institūtā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Ūdeņradis un tā iegūšana

Ūdeņradis ir bezkrāsaina, degoša gāze bez smakas ar šķīdību ūdenī – 21,5 mL H₂ uz 1 L H₂O pie 0°C un 101,3 kPa. Tā kušanas temperatūra ir -259,2°C. Viršanas temperatūra ir -252,8°C. Ūdeņraža blīvums pie 0°C un 101,3 kPa ir 0,08987 kg/m³, kas ir aptuveni 14 reizes mazāks par gaisu šajos pašos apstākļos (Wiberg et al. 2001).

Šobrīd ūdeņradis veido vairāk nekā 2% no pasaulē saražotās enerģijas (Suleman et al. 2016), un ūdeņraža produkcija pārsniedz 1 miljardu m³ saražotā H₂ dienā, no kā 48% iegūst no dabasgāzes, 30% no naftas, 18% no akmeņoglēm un pārējos 4% iegūst, veicot ūdens elektrolīzi (Chandrasekhar et al. 2015). Ūdeņradis tiek iegūts arī, izmantojot atjaunojamo resursu, piemēram, saules, vēja un ģeotermālo enerģiju. Galvenā metode ūdeņraža iegūšanai ir tvaika reformācijas metode, kur pie augstas temperatūras un spiediena ūdens tvaiks reaģē ar metānu, radot ūdeņradi un oglekļa monoksīdu. Oglekļa monoksīds, reaģējot ar ūdeni, rada papildus ūdeņradi un ogļskābo gāzi (Suleman et al. 2016):

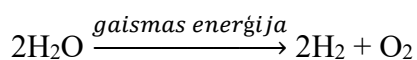


1.2. Bioudeņradis

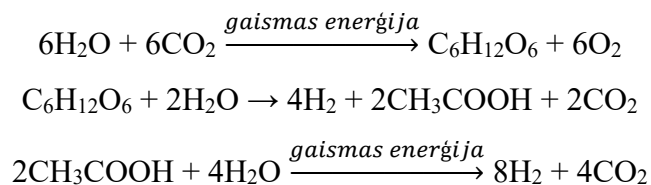
Ūdeņradis var tikt producēts arī bioloģisku procesu rezultātā. Tiek izdalīti četri galvenie bioudeņraža iegūšanas veidi: tiešā biofotolīze, netiešā biofotolīze, fotofermentācija un tumsas fermentācija.

Biofotolīzē ūdeņradi spēj producēt mikroskopiskās aļģes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella* u.c.) un cianobaktērijas (*Anabaena variabilis*, *Nostoc punctiforme*, *Synechocystis* sp. u.c.). Process norisinās mikroskopisko aļģu hloroplastos. Cianobaktērijām biofotolīze notiek heterocistās (Chandrasekhar et al. 2015).

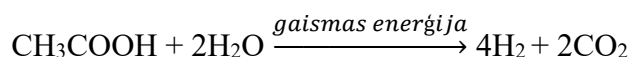
Tiešajā biofotolīzē fotosintēzes gaismas reakcijās ūdens tiek sadalīts par skābekli, ūdeņraža joniem un elektroniem. Elektronus fotosistēma II un fotosistēma I transportē uz ferredoksīnu. Ferredoksīns reducē hidrogenāzi (vai nitrogenāzi cianobaktērijās), kas tālāk pārvērš ūdeņraža jonus ūdeņraža gāzē. Tiešās biofotolīzes vispārīgs vienādojums:



Netiešā biofotolīze sākas ar fotosintēzi, kur gaismas enerģija tiek pārvērsta ķīmiskajā enerģijā, reducējot CO₂ par organisku savienojumu, no kā vēlāk tiek iegūts ūdeņradis. Parasti netiešā biofotolīze notiek sekojoši (Azwar et al. 2014):



Fotofermentācija ir process, kurā baktērijas, izmantojot gaismas enerģiju, anaerobos apstākļos oksidē organiskus savienojumus (acetātu, laktātu, butirātu u.c.), veidojot ogļskābo gāzi un ūdeņradi (Chandrasekhar et al. 2015):



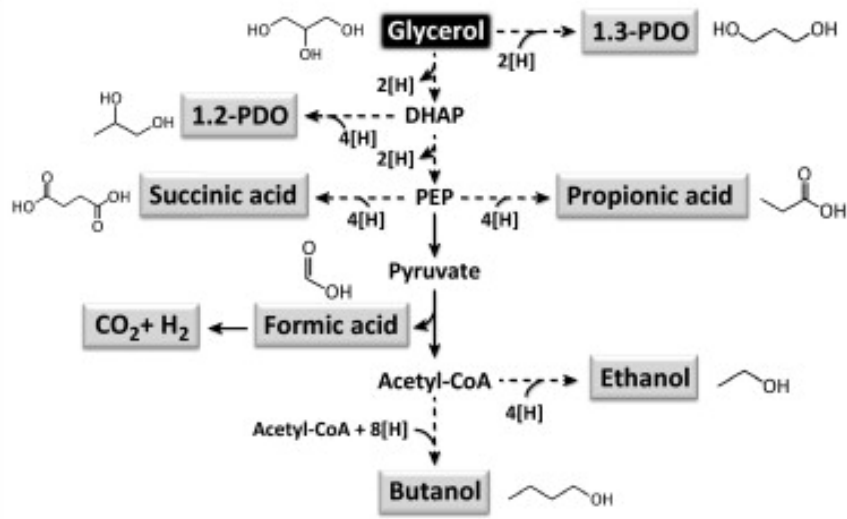
Reakciju katalizē enzīms nitrogenāze. Fotofermentācija notiek līdzīgi netiešās biofotolīzes beigū daļai, tikai šajā gadījumā organiskie savienojumi tiek iegūti nevis fotosintēzes ceļā, bet no substrāta. Fotofermentācijas veidā ūdeņradi producē purpura nesēra baktērijas, piemēram, *Rhodobacter sphaeroides*.

Tumsas fermentācijā ūdeņradis veidojas, baktērijām metabolizējot organisku substrātu anaerobos apstākļos bez gaismas klātbūtnes. Par substrātu var izmantot glikozi, cieti, celulozi, ksilozi, dažādus pārtikas atkritumus, kā arī rūpniecības atkritumus, piemēram, jēlglicerīnu (Azwar et al. 2014). Glicerīna anaerobās fermentācijas shēma parādīta 1. attēlā (Clomburg, Gonzalez 2013).

Tumsas fermentācija visbiežāk notiek, substrātu katabolizējot līdz piruvātam. Tumsas fermentācijas reakcijās bez ūdeņraža var papildus veidoties organiskās skābes, piemēram, etiķskābe, propionskābe, sviestskābe, ābolskābe, kā arī etanols un butanols (Chandrasekhar et al. 2015). Šos produktus var izmantot ķīmiskās un pārtikas rūpniecības un farmācijas vajadzībām (Clomburg, Gonzalez 2013). Tumsas fermentācija ir raksturīga fakultatīvi anaerobām baktērijām (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Citrobacter intermedius* u. c.) un obligāti anaerobām baktērijām, piemēram, *Clostridium butyricum*.

Fakultatīvi anaerobās baktērijās darbojas enzīms piruvāt:formiāt liāze, kas piruvātu pārveido par acetylCoA un skudrskābi. Skudrskābi formiāt:H₂ liāze pārveido par ūdeņradi un ogļskābo gāzi.

Obligāti anaerobās baktērijās enzīms piruvāt-ferredoksīn oksidoreduktāze pārveido piruvātu par acetylCoA un ogļskābo gāzi. Reakcijā notiek elektrona atdošana ferredoksīnam, kas veic hidrogenāzes reducēšanu. Reducētā hidrogenāze katalizē no NADH/FADH iegūtu ūdeņraža jonu reducēšanu par ūdeņradi (Chandrasekhar et al. 2015).



1. attēls. Glicerīna anaerobā fermentācija. Saīsinājumi: DHAP – dihidroksiacetona fosfāts; PEP – fosfoenolpiruvāts; 1,2-PDO – 1,2-propāndiols; 1,3-PDO – 1,3-propāndiols (Clomburg, Gonzalez 2013).

Figure 1. Anaerobic fermentation of glycerol. Abbreviations: DHAP – dihydroxyacetone phosphate; PEP – phosphoenolpyruvate; 1,2-PDO – 1,2-propanediol; 1,3-PDO – 1,3-propanediol (Clomburg, Gonzalez 2013).

Bioudeņradi var efektīvi producēt arī hibrīdās sistēmas, kas satur dažādas baktēriju kultūras un apvieno dažādus udeņraža iegūšanas veidus, piemēram, fotofermentāciju un tumsas fermentāciju. Šādā veidā tumsas fermentācijā producētās organiskās skābes var tikt izmantotas par substrātu fotofermentācijas reakcijām (Balat, Kirtay 2010).

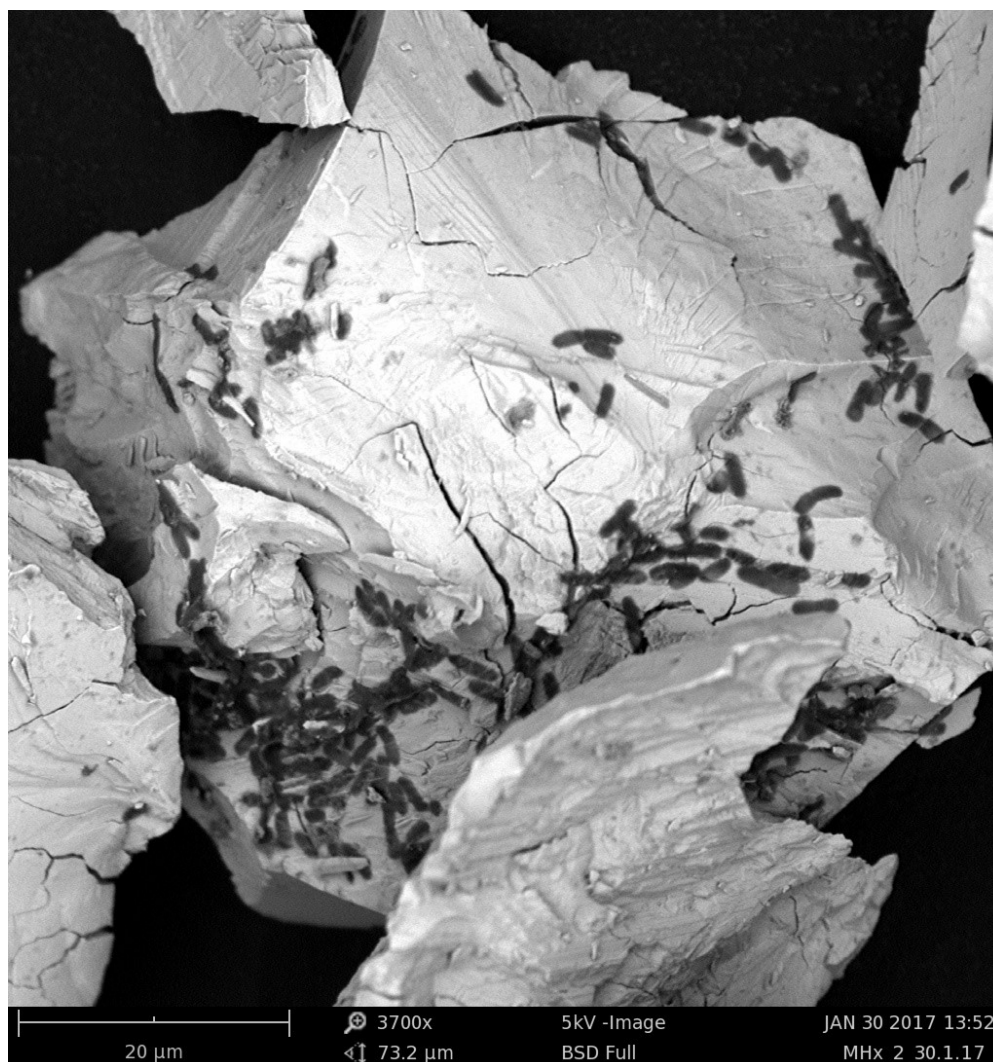
1.3. Darbā izmantoto baktēriju raksturojums

Enterobacter aerogenes (2. attēls) ir kustīgas, nesporulējošas, Gram-negatīvas, fakultatīvi anaerobas, mezofilas, nūjiņveida baktērijas. Tās pieder *Gammaproteobacteria* klasei, *Enterobacteriales* rindai, *Enterobacteriaceae* dzimtai un *Enterobacter* ģintij.

Enterobacter ģints baktēriju diametrs ir 0,6 līdz 1,0 μm, garums no 1,2 līdz 3,0 μm (Garrity et al. 2006). Tās ir sastopamas augsnē, ūdenī, piena produktos, kā arī cilvēka un dzīvnieku zarnu traktā (Atlas, Bartha 1998).

E. aerogenes cilvēkam ir nosacīti patogēnas baktērijas, kas slimnīcu apstākļos spēj izraisīt infekcijas pacientiem ar novājinātu imunitāti, kā arī iegūt multirezistenci pret antibiotikām (Davin-Regli, Pagès 2015). *E. aerogenes* mēdz izraisīt urīnceļu iekaisumu (Madigan, Martinkko 2006).

E. aerogenes spēj veikt tumsas fermentāciju. Fermentējot glikozi, rodas organiskas skābes un gāze, ko veido ūdeņradis un oglekļa dioksīds ($\text{CO}_2:\text{H}_2$ attiecība parasti ir 2:1) (Garrity et al. 2006).



2. attēls. *E. aerogenes* LMKK 758 uz LaNi_5 sakausējuma virsmas. Attēls uzņemts ar skenējošo elektronmikroskopu (A. Gruduls).

Figure 2. *E. aerogenes* MSCL 758 on the surface of LaNi_5 alloy. Image captured using scanning electron microscope (A. Gruduls).

Ūdeņraža produkcijai tumsas fermentācijā optimālais pH ir no 6 līdz 7. Tam pazeminoties, ūdeņraža producēšana tiek pārtraukta. Neitrālu pH ir grūti uzturēt, jo tumsas fermentācijā rodas organiskas skābes, kas pH pazemina. Ir izolēts *E. aerogenes* celms HO-39, kas spēj producēt ūdeņradi pat pie pH 4,0 (Yokoi et al. 1995).

1.4. Ūdeņraža uzglabāšanas metodes

Salīdzinot ar citām degvielām, ūdeņradis degšanas procesā izdala visvairāk siltuma enerģijas uz masas vienību. Tas arī ir atjaunojams un videi draudzīgs enerģijas nesējs. Tomēr ūdeņraža plašu pielietojanu kā enerģijas uzkrājēju apgrūtina tā uzglabāšanas apsvērumi. Lai palielinātu ūdeņraža blīvumu, tiek izmantotas vairākas metodes, piemēram:

- 1) ūdeņraža uzglabāšana augstspiediena balonos, kuros maksimālais spiediens visbiežāk ir 20 MPa. Ir radīti arī kompozītmateriālu augstspiediena baloni ar maksimālo spiedienu 80 MPa, pie kā ūdeņraža blīvums ir 36 kg/m^3 .
- 2) ūdeņraža uzglabāšana sašķidrinātā veidā pie temperatūras -252°C . Šķidrā agregātstāvoklī ūdeņraža blīvums ir $70,8 \text{ kg/m}^3$ (Zuttel 2004).
- 3) ūdeņraža adsorbcija uz materiāliem ar lielu virsmas laukumu, piemēram, oglekļa nanocaurulītēm (Sakintuna et al. 2007).
- 4) ūdeņraža saistīšana metālhidrīdos vai hidrīdu kompleksos.

Vislielāko ūdeņraža blīvumu var iegūt, to uzglabājot metālhidrīdu vai hidrīdu kompleksu veidā. Vairāki metāli un to sakausējumi ir spējīgi atgriezeniski saistīt lielu ūdeņraža daudzumu, veidojot metālhidrīdus (Zuttel 2004). Spēju saistīt ūdeņradi nosaka izmantotais metāls vai metālu sakausējums, tā tīrība, morfoloģija un virsmas struktūra. Lai metāls būtu praktiski izmantojams ūdeņraža uzglabāšanā, tam ir jāatbilst sekojošiem nosacījumiem:

- 1) liela ūdeņraža ietilpība uz metāla masas vienību;
- 2) zema disociācijas temperatūra;
- 3) vidējs disociācijas spiediens;
- 4) zema siltuma izdalīšanās hidrīdu veidošanās laikā;
- 5) spēja ūdeņradi saistīt un atbrīvot atkārtoti;
- 6) ātra reakcijas norise;
- 7) augsta metāla izturība pret skābekli un mitrumu;
- 8) zemas otrreizējās pārstrādes izmaksas (Sakintuna et al. 2007).

Ūdeņradis pie paaugstinātas temperatūras spēj reaģēt ar vairākiem pārejas metāliem un to sakausējumiem, veidojot metālhidrīdus. Vislabāk reaģē elektropozitīvie elementi, piemēram, skandijš (Sc), itrijs (Y), lantanīdi, aktinīdi, kā arī titāna (Ti) un vanādija (V) grupas elementi. Pārejas metālu binārajiem hidrīdiem (MH_n) ir izteiktas metāliskas īpašības, tie bieži uzrāda lielas novirzes no ideālas stohiometrijas ($n = 1, 2, 3$) un var eksistēt kā vairākfāžu sistēmas. Šo savienojumu kristālrežģa struktūra ir tāda kā tipiskam metālam, bet ar ūdeņraža atomiem starp mezglu punktiem. Šajā sistēmā ūdeņradim ir daļēji negatīvs lādiņš, kas ir atkarīgs no metāla,

bet ir izņēmums – $\text{PdH}_{0,7}$. Ūdeņraža atomi kristālrežģī var atrasties tukšumos oktaedriskā pozīcijā, tetraedriskā pozīcijā vai abu pozīciju kombinācijā (3. attēls) (Zuttel 2003).



3. attēls. Lantāna monohidrīda (LaH), dihidrīda (LaH_2) un trihidrīda (LaH_3) kristālrežģa struktūra. Lantāns – dzeltens; ūdeņraža atoms oktaedriskā pozīcijā – gaiši zils; ūdeņraža atoms tetraedriskā pozīcijā – tumši zils (Machida et al. 2012).

Figure 3. Crystal structure of lanthanum mono-hydride (LaH), di-hydride (LaH_2) and tri-hydride (LaH_3). Lanthanum – yellow; hydrogen atom in an octahedral site – light blue; hydrogen atom in a tetrahedral site – dark blue (Machida et al. 2012).

Ūdeņraža uzglabāšanā tiek lietoti arī intermetāliskie savienojumi (AB_xH_n) (Zuttel 2003). Tie satur elementu ar lielu ūdeņraža saistīšanas spēju (elements A) un elementu ar zemu ūdeņraža saistīšanas spēju (elements B). Ūdeņraža saistīšanai izmanto AB_2 un AB_5 klases metālu sakausējumus, kur A ir retzemju metāls vai retzemju metālu sakausējums, bet B ir niķelis vai kāds cits pārejas metāls (Rajalakshmi et al. 2000). Par elementu B bieži izmanto niķeli, jo tas labi katalizē ūdeņraža disociāciju atomos. Izmainot intermetālisko savienojumu sastāvu, var pielāgot to īpašības.

Citas intermetālisko savienojumu grupas (ar piemēriem) – AB_3 (CeNi_3 , YFe_3), A_2B_7 (Y_2Ni_7 , Th_2Fe_7), A_6B_{23} (Y_6Fe_{23}), AB (TiFe , ZrNi), A_2B (Mg_2Ni , Ti_2Ni).

Lielākajai daļai metālhidrīdu absorbēto ūdeņraža atomu un metāla atomu (H/M) attiecība nepārsniedz 2, bet ir savienojumi ar lielāku attiecību, piemēram, BaReH_9 ($\text{H/M} = 4,5$).

Sava vieglā svara un lielās ūdeņraža ietilpības dēļ tiek pētīti arī metāla hidrīdu kompleksi. Tajos metāls pēc ūdeņraža saistīšanas veido kompleksu savienojumu, piemēram, izmantojot alumīniju vai boru, pēc ūdeņraža saistīšanas veidojas anjoni $[\text{BH}_4]^-$ un $[\text{AlH}_4]^-$, kurus kompensē katjoni, piemēram, Na^+ (Zuttel 2003).

Viens no visvairāk pētītajiem sakausējumiem ūdeņraža uzglabāšanai ir AB₅ klases sakausējums LaNi₅ (Sakintuna et al. 2007). Tas spēj saistīt līdz apmēram 1,8% ūdeņraža uz kopējo masu (Matar 2010). Tomēr tā izmaksas ir relatīvi lielas, un ūdeņraža saistīšanas spēja samazinās pēc dažiem izmantošanas cikliem (Sakintuna et al. 2007).

Komerčiāli pieejamajiem AB₅ sakausējumiem parasti ir jaukts sastāvs – A pozīcija parasti satur cēriju (Ce), lantānu (La), neodīmu (Nd) un prazeodīmu (Pr), bet B pozīcijā ir niķelis (Ni), alumīnijs (Al), mangāns (Mn), kobalts (Co), kā arī citi metāli (Srinivasan et al. 2014).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Izmantotās iekārtas un piederumi

Barotņu sagatavošana un baktēriju kultivēšana tika veikta, izmantojot Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras laboratorijas iekārtas un piederumus (1. tabula). Barotņu gāzes fāzes sastāva noteikšana ar masspektrometru, elektronmikroskopija un termogravimetrija tika veikta, izmantojot Latvijas Universitātes Cietvielu fizikas institūta iekārtas (2. tabula).

1. tabula

Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras laboratorijas iekārtas un piederumi.

Table 1

Laboratory equipment of Department of Microbiology and Biotechnology.

Nosaukums	Ražotājs, ražotājvalsts
Alumīnija vāciņi seruma pudelēm	Supelco, ASV
Autoklāvs	Sanyo Electric Co., Ltd., Japāna
Centrifūga 5417R	Eppendorf AG, Vācija
Centrifūga 5810R	Eppendorf AG, Vācija
Fotometrs MD 200	Tintometer GmbH, Vācija
Gumijas aizbāžņi seruma pudelēm	Gotlands Gummifabrik, Zviedrija
Laboratorijas sviri	Adrona, Latvija
Laminārās plūsmas skapis BH-EN 2005	Faster, Itālija
Mikrocentrifūga Sigma 1-14	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Vācija
Petri plates	Sarstedt, Vācija
pH metrs AD1405	Adrona, Latvija
PVDF filtri ar poru diametru 0,22 μm	Carl Roth GmbH, Vācija
Seruma pudeļu aizvākotājs	Supelco Analytical, ASV
Seruma pudeļu atvākotājs	Supelco Analytical, ASV
Spektrofotometrs Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences, ASV
Stikla seruma pudeles (50 mL)	Supelco, ASV
Termoreaktors RD 125	Tintometer GmbH, Vācija
Termostats KB53	Binder, Vācija
Vienreizējās lietošanas šļirces	Sagimed, Ķīna

2. tabula

Cietvielu fizikas institūta laboratorijas iekārtas.

Table 2

Laboratory equipment of Institute of Solid State Physics.

Nosaukums	Ražotājs, ražotājvalsts
Diferenciālais termogravimetrs DTG-60	Shimadzu, Japāna
Laboratorijas svāri GR-200	A&D, Japāna
Masspektrometrs RGAPro 100	Hy-Energy, Francija
Skenējošais elektronmikroskops Phenom Pro	Phenom World, Nīderlande
Termostats	Memmert, Vācija

Abus pētījumā izmantotos AB₅ tipa sakausējumus ieguva no Cietvielu fizikas institūta. LaNi₅ sakausējumu CFI iegādājās no Treibacher Industrie AG (Vācija), jaukta sastāva AB₅ sakausējumu (3. tabula) – no Gesellschaft für Elektrometallurgie (Vācija). CFI metāla sakausējumu sagatavoja izmantošanai, vairākas reizes karsējot līdz 170°C un atdzesējot ūdeņraža atmosfērā, līdz panāca efektīvu ūdeņraža saistīšanos.

3. tabula

Jaukta sastāva AB₅ sakausējuma saturs

Table 3

Contents of multicomponent AB₅ alloy

Elements	Saturs
A	La (52%) Ce (30,23%) Nd (12,93%) Pr (4,81%)
B	Co Mn Al

2.2. Izmantotās baktērijas

Darbā tika izmantotas baktērijas no LU Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijas – *Enterobacter aerogenes* LMKK 758 un *Pseudomonas putida* LMKK 650.

2.3. Baktēriju kultivēšana anaerobos apstākļos

Baktērijas tika kultivētas šķidrās, anaerobās 35 mL barotnēs. Baktēriju kultivēšanai nepieciešamās barotnes sastāvdaļas (4. tabula) izšķīdināja ūdenī un sterilizēja autoklāvā 15 minūtes 120°C temperatūrā.

4. tabula

Barotnes sastāvs.

Table 4

Growth medium ingredients.

Sastāvdaļa	Daudzums, g/L	Daudzums uz 35 mL barotni, mg	Ražotājs, ražotājvalsts
Triptons	1,0	35	Fluka Biochem, Šveice
Rauga ekstrakts	2,5	87,5	Sifin, Vācija
Cisteīns HCl·H ₂ O (tiek pievienots atsevišķi pēc barotnes sterilizācijas)	0,5	17,5	Sigma-Aldrich, Vācija
Glicerīns (noteiktiem barotņu paraugiem)	6,0	210	Stanlab, Polija
Jēlglicerīns (noteiktiem barotņu paraugiem)	6,0	210	Bio-Venta, Latvija

Autoklāvā sterilizēja arī 50 mL stikla seruma pudeles. Pēc sterilizācijas seruma pudelēs ielēja 35 mL sterilizētās barotnes un pievienoja 0,1 mL sagatavota cisteīna šķidruma ar koncentrāciju 175 g/L, kas tika sterilizēts, to filtrējot caur PVDF filtru ar poru diametru 0,22

µm. Pēc tam noteiktiem barotņu paraugiem nosvēra un pievienoja vienu gramu aktivēta AB₅ sakausējuma pulvera veidā, kā arī 0,2 mL svaigas baktēriju suspensijas. Lai izvairītos no metāla sakausējuma saskares ar gaisu, AB₅ pulveris tika pievienots barotnēm anaerobā boksā, kas tika izpūsts ar argona gāzi. Atsevišķos eksperimentos, nepārtraukti mērot barotnes pH ar pH metru, barotnei vai kontrolei ar ūdeni pievienoja HCl (Centro-Chem, Polija) vai NaOH (BDH, Lielbritānija) līdz ieguva noteiktu pH līmeni.

Pēc barotņu pagatavošanas un baktēriju pievienošanas pudeles hermētiski noslēdza ar sterilu gumijas aizbāzni un alumīnija vāciņu. Gumijas aizbāzni caurdūra ar divām adatām – pa vienu adatu pievadīja barotnes šķidrums fāzei argonu (SIA AGA, Latvija), pa otru adatu ļāva gāzei no pudeles izplūst, neradot pārspiedienu pudelē. Ar argonu katru pudeli izpūta apmēram pusotru minūti. Rezultātā barotnes gāzes fāzi nomainīja argons, nodrošinot anaerobus apstākļus. Daļā eksperimentu paraugs tika izpūsts ar ūdeņradi (SIA AGA, Latvija). Atsevišķos eksperimentos ar 20 mL šļirci pudelē tika ievadīta papildus gāze (argons vai ūdeņradis), radot paaugstinātu spiedienu. Pēc pudēļu izpūšanas barotnes sakratīja un inkubēja termostatā 24 ± 2 stundas 37°C temperatūrā.

Lai noteiktu baktēriju koncentrāciju suspensijā, to atšķaidīja 1/10 ar sterilu ūdeni un ar spektrofotometru noteica atšķaidītās suspensijas absorbciju pie viļņu garuma 540 nm.

Atsevišķos eksperimentos pēc kultivēšanas tika noteikts baktēriju daudzums barotnē (kvv/mL). Lai noteiktu baktēriju daudzumu barotnē, no barotnes šķidrās fāzes paņēma paraugu, pagatavoja piecu atšķaidījumu sērijas un no katra no atšķaidījumiem 100 µl uzsēja uz Petri platēm ar agarizētu R2A barotni. Barotnes tika kultivētas istabas temperatūrā 2 – 3 dienas. Pēc kultivēšanas saskaitīja izaugušās kolonijas un aprēķināja kolonijas veidojošo vienību (kvv) skaitu uz mililitru barotnes.

Agarizēto R2A barotņu pagatavošanai paredzēto maisījumu (Difco R2A Agar, Becton, Dickinson and Company, ASV) suspendēja ūdenī (18,2 gramu uz vienu litru ūdens) un autoklavēja 15 minūtes 121°C temperatūrā. Pēc autoklavēšanas barotnes lēja Petri platēs ar diametru 9 cm – uz vienu Petri plati aptuveni 25 mL barotnes.



4. attēls. Eksperimentos izmantotās barotnes pēc 24 h kultivācijas. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅.

Figure 4. Growth media used in experiments after 24 h of cultivation. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy.

2.4. Gāzu analīzes

Pēc 24 stundu inkubācijas barotnēm noteica gāzes fāzes sastāvu, caurdurot seruma pudeles gumijas aizbāzni ar adatu un ievadot gāzes paraugu masspektrometrā. Gāzu spektra analīzei izmantoja programmu rga 3.0 (Stanford Research System, ASV).

Katru paraugu gatavoja 2 atkārtojumos. Otrajam barotņu atkārtojumam neveica masspektrometriju, bet noteica izdalītās gāzes tilpumu, pēc 24 stundu inkubācijas caurdurot seruma pudeles gumijas aizbāzni ar 20 mL vienreizējās lietošanas šļirci. Ja barotnes gāzes fāzē bija pārspiediens, tad gāze ieplūda šļircē, kur varēja nolasīt inkubācijas laikā izdalītās gāzes tilpumu.

2.5. Hromatogrāfija

Daļā eksperimentu pēc inkubācijas un gāzu analīzēm pudelēs esošā barotne tika pārlieta endorfa mēģenēs un centrifugēta, lai no barotnes atdalītu baktērijas un suspendēto AB₅ sakausējumu. Iegūtais supernatants tika ar pipeti pārnesti uz citām mēģenēm, kuras sasaldēja līdz barotnes sastāva analīžu veikšanai ar hromatogrāfu LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā. Hromatogrāfija tika veikta ar augstefektīgo šķidrums hromatogrāfu Agilent 1100 (Agilent Technologies, ASV), izmantojot Shodex Asahipak SH1011 (Showa Denko, Japāna) kolonnu (kolonnas garums – 300 mm, iekšējais diametrs – 8,0 mm) ar priekškolonnu SH-G (garums – 50 mm, iekšējais diametrs – 6 mm), pie temperatūras 50°C. Mobilā fāze – 0,01 N H₂SO₄. Mobilās fāzes ātrums – 0,6 mL/min. Kolonnā ievadāmā parauga daudzums – 5 µl. Glicerīna un etanola noteikšanai tika izmantots diferenciālais refraktometrijas detektors RID G1362. Organiskās skābes noteiktas, izmantojot diodu matricas detektoru (DAD) G1315B, viļņa garums – 210 nm.

2.6. Termogravimetrija

Pēc barotņu inkubācijas un gāzu analīzēm barotnes saturu pārļēja vārglāzē un gaidīja, līdz AB₅ pulveris nosēdās vārglāzes apakšā. Lieko barotnes šķidrumu nolēja nost un AB₅ pulveri vairākas reizes skaloja ar ūdeni. Ieguva metāla sakausējuma pulvera suspensiju ūdenī, ko filtrēja caur filtrpapīru. Filtrpapīrus ar metāla sakausējumiem žāvēja 1 līdz 12 stundas istabas temperatūrā vai ledusskapī pie 4°C ar ventilatoru līdz termogravimetrijas veikšanai. Pēc nožāvēšanas nosvēra aptuveni 70 mg parauga un ievietoja alumīnija tīģelī, ko pēc tam ievietoja termogravimetrā. Ar termogravimetru paraugam noteica sākotnējo masu un masas zudumu karsējot līdz 155°C. Karsēšana notika, temperatūrai paaugstinoties par 10°C minūtes laikā.

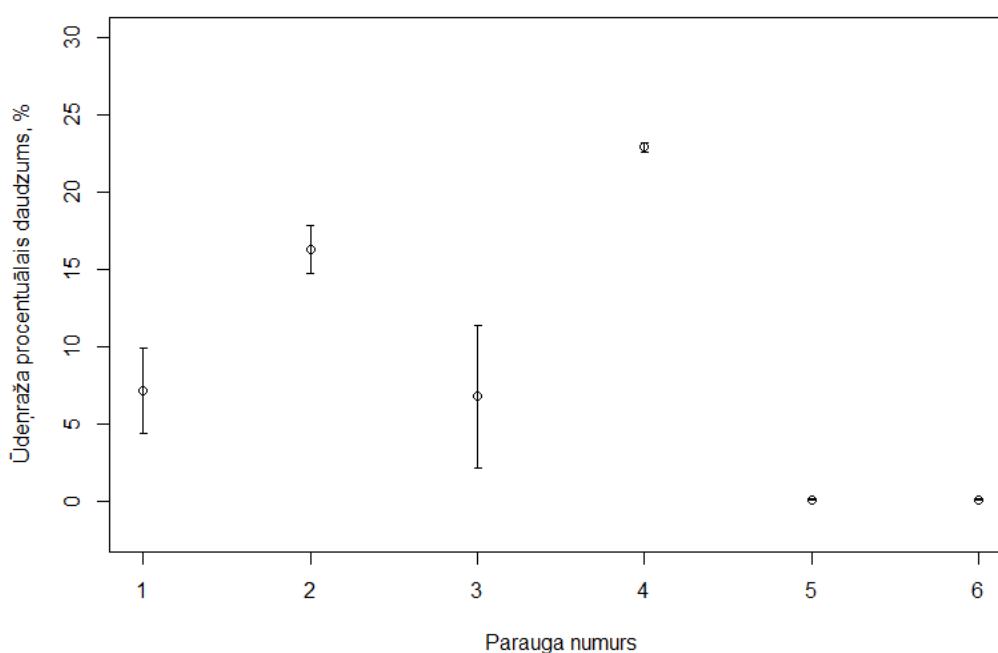
2.7. Datu statistiskā apstrāde

Statistikajā apstrādē un datu attēlošanā tika izmantota programmas R versija 3.2.3. Par rezultātu būtiskuma līmeni pieņēma 0,05. Vidējo aritmētisko salīdzināšanai tika izmantota funkcija t.test. Pīrsona korelācijas koeficients tika noteikts, izmantojot funkciju cor.test. Vidējās vērtības un to standartnovirzes grafiski tika attēlotas izmantojot funkciju plot.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Barotņu gāzes fāzes masspektrometriskā analīze

Ar masspektrometru nosakot barotņu gāzes fāzes sastāvu pēc 24 stundu kultivēšanas (5. attēls), vislielāko ūdeņraža daudzumu konstatēja 4. paraugā, kas satur barotni, glicerīnu, *E. aerogenes* un jaukta sastāva AB₅ sakausējumu – maksimālais ūdeņraža daudzums 23,1%. Kontroles paraugi, kam netika pievienotas baktērijas, uzrādīja niecīgu ūdeņraža daudzumu (0,0% – 0,2%).



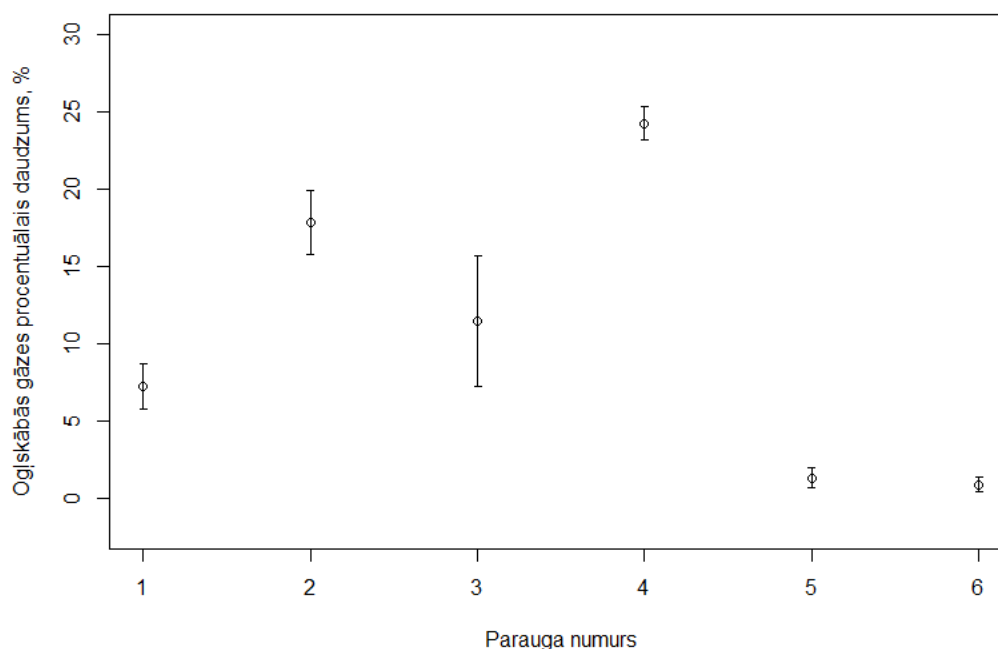
5. attēls. Vidējais ūdeņraža daudzums (%) barotņu gāzes fāzē pēc 24 h kultivācijas. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅; 5. – barotne, glicerīns; 6. – barotne, glicerīns, LaNi₅.

Figure 5. Average amount of hydrogen (%) in the gas phase sample of growth media after 24 h of cultivation. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy; 5. – growth medium, glycerol; 6. – growth medium, glycerol, LaNi₅.

Salīdzinot 1. un 2. paraugu, tika noteikta statistiski būtiska ietekme glicerīna pievienošanai uz ūdeņraža daudzumu gāzes fāzē ($p = 0,0195$). Paraugā, kas nesaturēja glicerīnu, procentuālais ūdeņraža daudzums vidēji bija 7,1%, paraugā, kas saturēja glicerīnu – 16,3%. Salīdzinot 2. un 3. paraugu, tika noteikts, ka LaNi_5 sakausējuma pievienošana barotnei statistiski būtiski samazināja ūdeņraža procentuālo daudzumu gāzes fāzē ($p = 0,00016$). Paraugš, kas saturēja LaNi_5 , uzrādīja vidējo ūdeņraža procentuālo daudzumu 6,7%. Jaukta sastāva AB_5 sakausējuma pievienošana barotnei uzrādīja statistiski būtisku ($p = 4.7 \times 10^{-6}$) ūdeņraža procentuālā daudzuma palielināšanos salīdzinājumā ar 2. paraugu, kas AB_5 pulveri nesaturēja. Vidējais ūdeņraža procentuālais daudzums paraugā ar jaukta sastāva AB_5 sakausējumu – 22,9%.

Atsevišķos eksperimentos kā kontroli termogravimetrijas mērījumiem izmantoja *Pseudomonas putida*, kas ir aerobas nūjiņveida baktērijas (Garrity et al. 2006) – anaerobos apstākļos ūdeņradi neražo. Visi paraugi, kas saturēja *E. aerogenes* (1. – 4.), pēc ūdeņraža procentuālā daudzuma uzrādīja statistiski būtisku atšķirību no kontroles paraugiem (5. un 6.), kas *E. aerogenes* nesaturēja, kā arī no parauga, kas saturēja *Pseudomonas putida* kontroli. Paraugā ar *Pseudomonas putida* noteiktais ūdeņraža daudzums bija 0,1%.

Paraugos, kas saturēja *E. aerogenes*, tika konstatēts arī palielināts CO_2 daudzums (6. attēls) – ogļskābā gāze ir viens no tumsas fermentācijas produktiem, kas veidojas reizē ar ūdeņradi. Ogļskābās gāzes procentuālā daudzuma rezultāti lielā mērā atkārtoja ūdeņraža procentuālā daudzuma rezultātus. Statistiski būtiski atšķīrās 1. un 2. paraugs – ar un bez glicerīna pievienošanas ($p = 0,000176$), 2. un 3. paraugs – ar un bez LaNi_5 pievienošanas ($p = 0,00185$), kā arī 2. un 4. paraugs ar un bez jaukta sastāva AB_5 pievienošanas ($p = 0,00619$). Visi paraugi, kas saturēja *E. aerogenes* (1. – 4.), statistiski būtiski atšķīrās no abiem kontroles paraugiem (5. un 6.) un no *Pseudomonas putida* kontroles.



6. attēls. Vidējais ogļskābās gāzes daudzums (%) barotņu gāzes fāzē pēc 24 h kultivācijas. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅; 5. – barotne, glicerīns; 6. – barotne, glicerīns, LaNi₅.

Figure 6. Average amount of carbon dioxide (%) in the gas phase sample of growth media after 24 h of cultivation. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy; 5. – growth medium, glycerol; 6. – growth medium, glycerol, LaNi₅.

Visos paraugos izmērītais CO₂ procentuālais daudzums bija lielāks par H₂ procentuālo daudzumu. Šo sakarību var skaidrot ar to, ka pēc seruma pudeļu izpūšanas viss skābeklis nebija pilnībā apmainījies ar argonu. Rezultātā *E. aerogenes* veica aerobo elpošanu, metabolizējot nedaudz pāri palikušo O₂ par CO₂. Tomēr visos paraugos, izņemot 3. paraugu ar LaNi₅ ($p = 0,0377$), šī sakarība nebija statistiski būtiska. Trešajā paraugā vidējais H₂ daudzums bija 6,7%, vidējais CO₂ daudzums – 11,5%. Tika arī konstatēta cieša pozitīva statistiski būtiska korelācija ($\rho = 0,916$, $p = 2.24 \times 10^{-9}$) starp izmērīto H₂ un CO₂ procentuālo daudzumu.

Vienā no eksperimenta veikšanas reizēm tika noteikts H₂ un CO₂ procentuālais daudzums paraugā ar *E. aerogenes*, barotni un jēlglicerīnu – 15,5% un 19,3%. Izmērītais H₂ un CO₂

procentuālais daudzums bija nedaudz augstāks paraugā ar *E. aerogenes*, barotni un glicerīnu šajā pašā eksperimenta veikšanas reizē – 17,1% un 19,8%.

Gandrīz visos eksperimentos izmēritajā gāzes sastāvā tika konstatēta neliela O₂, N₂, kā arī H₂O klātbūtne. To var izskaidrot gan ar nepilnīgu seruma pudeļu izpūšanu ar argonu, gan arī ar to, ka pirms gāzes parauga ievadīšanas nevarēja nodrošināt pilnīgu vakuumu masspektrometrā – tajā nelielos daudzumos iekļuva gaiss un ūdens no ārējās vides.

Netika konstatēta statistiski būtiska korelācija starp pēc absorbcijas noteikto relatīvo baktēriju koncentrāciju suspensijā (5. pielikums), ko pievienoja barotnēm, un H₂ procentuālo daudzumu paraugos ar *E. aerogenes*, barotni un glicerīnu ($p = 0,8366$). H₂ procentuālā daudzumu variēšanu starp paraugiem var skaidrot arī ar citiem faktoriem – pudeļu izpūšanas ar argonu efektivitāti, atšķirīgu ilgumu starp baktēriju pievienošanu un paraugu ielikšanu inkubēties, kā arī nelielām inkubācijas ilguma izmaiņām.

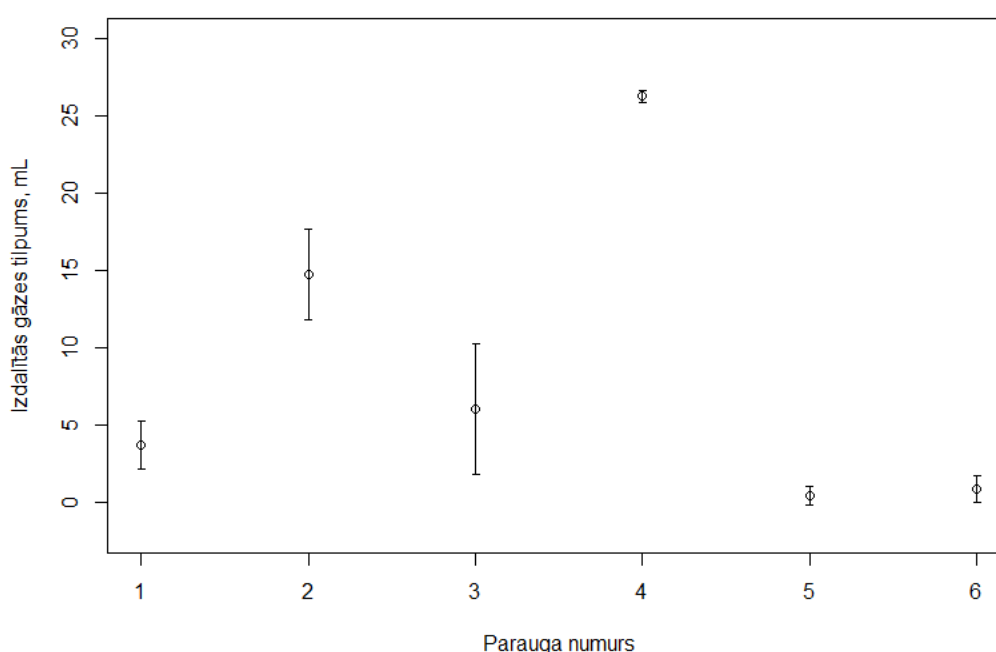
Fakts, ka pēc LaNi₅ pulvera pievienošanas barotņu gāzes fāzē samazinājās gan H₂, gan CO₂ procentuālais daudzums, norāda uz LaNi₅ inhibējošo ietekmi uz baktēriju augšanu vai anaerobā metabolisma ceļu, kurā rodas H₂ un CO₂. Jaukta sastāva AB₅ pulvera pievienošana savukārt atstāja pozitīvu ietekmi uz H₂ un CO₂ producēšanu. Iepriekšējos pētījumos ir izvirzīta hipotēze, ka pozitīvie rezultāti paraugos ar jaukta sastāva AB₅ pulveri ir saistīti ar to, ka baktērijas aug labāk, ja tām ir substrāts pie kā pieķerties (Valucka 2015). Tomēr nav pieejams pietiekami daudz informācijas, lai hipotēzi pārliecinoši apstiprinātu.

Vienā no eksperimenta veikšanas reizēm tika veikti mērījumi paraugam, kurā LaNi₅ pulveris tika pievienots barotnei pirms sterilizācijas autoklāvā, un pirms inkubācijas barotne tika atbrīvota no LaNi₅ pulvera, kas bija nosēdies pudeles apakšā. Iegūtie H₂ un CO₂ procentuālā daudzuma mērījumi šajā paraugā (9,5% un 11,6%) uzrādīja vēl lielāku inhibējošu ietekmi par paraugu, kas saturēja LaNi₅ pulveri inkubācijas laikā (13,0% un 15,4%). Paraugā, kas hidrīdus veidojošos metālus nesaturēja, H₂ un CO₂ daudzums bija 15,4% un 17,1%, savukārt paraugā ar jaukta sastāva AB₅ pulveri – 22,7% un 23,5%. Iegūtie rezultāti norāda uz to, ka LaNi₅ pulveris, tam atrodoties barotnē, izmaina tās sastāvu, inhibējot ūdeņraža producēšanu vai baktēriju augšanu, taču tajā pašā laikā savu fizikālo īpašību dēļ metāla pulvera (LaNi₅ vai jaukta sastāva AB₅) klātbūtne baktēriju augšanu uzlabo.

Tomēr iegūtie masspektrometrijas rezultāti neizslēdz ūdeņraža saistīšanos metāla hidrīdu veidā, jo LaNi₅ sakausējuma pievienošana samazināja vidējo H₂ procentuālo daudzumu par 58,5%, taču vidējo CO₂ procentuālo daudzumu tikai par 35,6%.

3.2. Izdalītās gāzes tilpums

Tā kā galvenās gāzes, kas izdalās *E. aerogenes* anaerobā metabolisma procesā, ir H₂ un CO₂, sakarības starp paraugiem H₂ un CO₂ procentuālajos daudzumos atkārtojās arī izdalītās gāzes tilpuma rezultātos (7. attēls). Tika konstatēta cieša pozitīva statistiski būtiska korelācija starp izdalītās gāzes tilpumu un H₂ procentuālo daudzumu ($\rho = 0,934$, $p = 2,08 \times 10^{-10}$), kā arī starp izdalītās gāzes tilpumu un CO₂ procentuālo daudzumu ($\rho = 0,957$, $p = 3,57 \times 10^{-12}$). Konstatēto korelāciju var izmantot, ja ir nepieciešams ātri noteikt aptuveno ūdeņraža producēšanas efektivitāti, jo masspektrometrijas metode ir laukietilpīga.



7. attēls. Vidējais izdalītās gāzes tilpums (mL) pēc 24 h kultivācijas. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅; 5. – barotne, glicerīns; 6. – barotne, glicerīns, LaNi₅.

Figure 7. Average gas production volume (mL) after 24 h of cultivation. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy; 5. – growth medium, glycerol; 6. – growth medium, glycerol, LaNi₅.

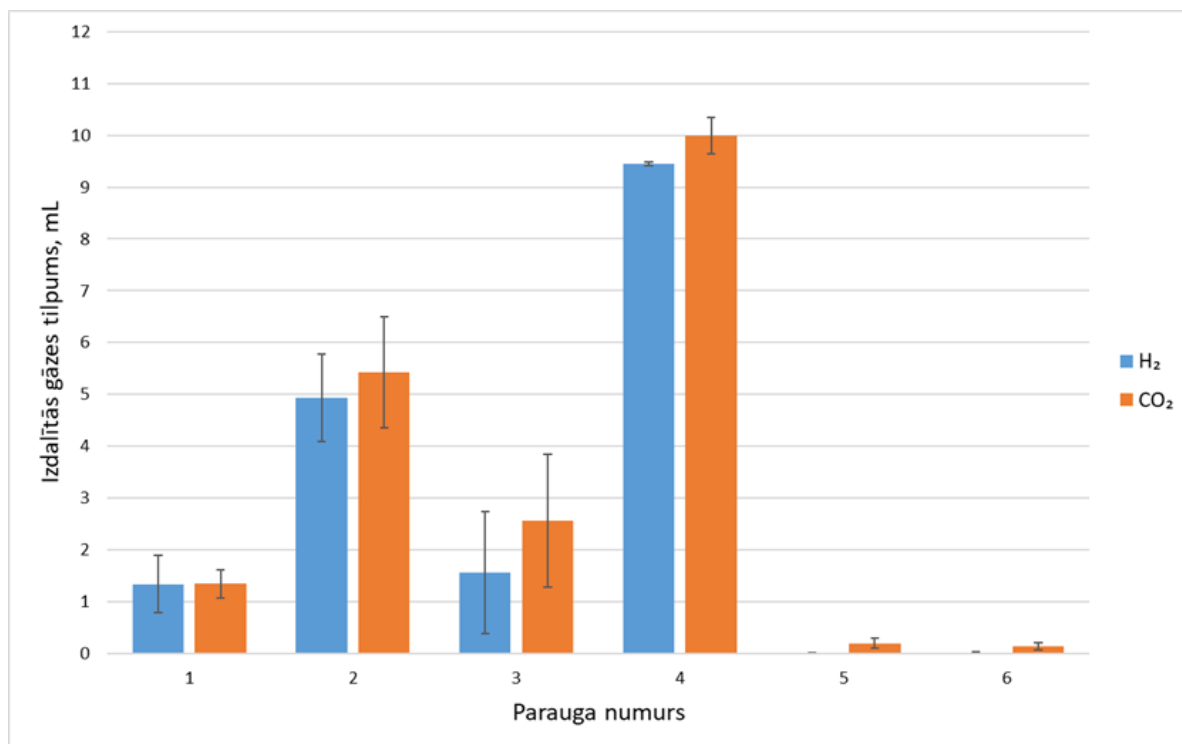
Vislielākais izdalītās gāzes tilpums tika konstatēts 4. paraugā, kas saturēja barotni, glicerīnu, *E. aerogenes* un jaukta sastāva AB₅ sakausējumu. Maksimālais izdalītās gāzes tilpums – 26,5 mL.

Statistiski būtiski atšķīrās 1. un 2. paraugs – ar un bez glicerīna pievienošanas ($p = 5,51 \times 10^{-5}$), 2. un 3. paraugs – ar un bez LaNi₅ pievienošanas ($p = 0,00015$), kā arī 2. un 4. paraugs ar un bez jaukta sastāva AB₅ pievienošanas ($p = 1,56 \times 10^{-6}$). Visi paraugi, kas saturēja *E. aerogenes*, izņemot 1. paraugu, statistiski būtiski atšķīrās no abiem kontroles paraugiem un no *Pseudomonas putida* kontroles.

Tā kā masspektrometrijas mērījumu veikšana samazina gāzes spiedienu pudelē, vienam un tam pašam paraugam nevarēja reizē veikt masspektrometriju un noteikt precīzu no parauga izdalītās gāzes tilpumu. Tādēļ katrs paraugs tika taisīts 2 atkārtojumos, kur vienam atkārtojumam veica masspektrometriju, otram – izdalītās gāzes tilpuma mērījumus. Lai arī atsevišķi eksperimenta apstākļi (precīzs inkubācijas ilgums, šūnu skaits baktēriju suspensijā un barotnes izpūšanas ar argonu efektivitāte) starp eksperimenta veikšanas reizēm nedaudz variēja, apstākļi bija diezgan nemainīgi vienas eksperimenta veikšanas reizes ietvaros. Tādēļ, ja pieņem, ka no barotnes izdalītās gāzes tilpums ir vienāds abos atkārtojumos, var izdarīt secinājumus par izdalīto H₂ un CO₂ tilpumu uz 35 mL barotnes (8. attēls).

Uz 35 mL barotnes vislielākais vidējais H₂ tilpums barotnes gāzes fāzē tika noteikts 4. paraugā ar jaukta sastāva AB₅ – 9,5 mL (par 93,9% vairāk nekā paraugā bez AB₅). Paraugš bez metāla hidrīdus veidojošu sakausējumu pievienošanas uzrādīja vidējo H₂ tilpumu 4,9 mL, paraugs ar LaNi₅ – 1,6 mL (par 67,3% mazāk nekā paraugā bez LaNi₅). Paraugā bez glicerīna uz 35 mL barotnes vidējā H₂ produkcija bija tikai 1,3 mL – glicerīna pievienošana palielināja *E. aerogenes* izdalītā ūdeņraža daudzumu par 276,9%.

Vienā no eksperimenta veikšanas reizēm tika noteikts izdalītā ūdeņraža tilpums paraugā ar *E. aerogenes*, barotni un jēlglicerīnu – 4,6 mL. Šajā pašā eksperimenta veikšanas reizē paraugā ar *E. aerogenes*, barotni un glicerīnu noteica izdalītā ūdeņraža tilpumu 5,2 mL, kas ir par 13,0% vairāk.



8. attēls. Vidējais producētā H₂ un CO₂ tilpums (mL) barotņu gāzes fāzē pēc 24 h kultivācijas. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅; 5. – barotne, glicerīns; 6. – barotne, glicerīns, LaNi₅.

Figure 8. Average gas production volume (mL) of H₂ and CO₂ after 24 h of cultivation. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy; 5. – growth medium, glycerol; 6. – growth medium, glycerol, LaNi₅.

3.3. Baktēriju daudzums barotnēs

Lai noteiktu, vai LaNi₅ un jaukta sastāva AB₅ sakausējuma ietekme uz gāzu izdalīšanos ir saistīta ar baktēriju daudzuma izmaiņām barotnē vai arī izmaiņām metabolismā, tika veikta kolonijas veidojošo vienību skaita noteikšana uz mililitru barotnes (5. tabula). Kolonijas veidojošo vienību skaita izmaiņa tika noteikta gan *E. aerogenes*, gan *P. putida*, lai zinātu, vai metāla hidrīdu veidojošo sakausējumu ietekme uz baktēriju daudzumu izpaužas dažādu taksonomisko grupu baktērijām.

Barotnēs ar *E. aerogenes* kolonijas veidojošo vienību skaitu statistiski būtiski samazināja gan LaNi₅ pievienošana ($p = 0,0389$), gan jaukta sastāva AB₅ pievienošana ($p = 0,0412$).

Barotnēs ar *P. putida* gan LaNi₅ pievienošana, gan jaukta sastāva AB₅ pievienošana statistiski būtisku ietekmi uz kolonijas veidojošo vienību skaitu neatstāja.

Iegūtie rezultāti diemžēl neatklāj patieso kolonijas veidojošo vienību skaitu barotnēs, jo uzņemtie elektronmikroskopijas attēli (2. attēls) liecina, ka pētījumā izmantotās baktērijas dzīvo un aug arī uz metāla hidrīdus veidojošo sakausējumu daļiņu virsmas. Lai arī, pagatavojot atšķaidījumu sērijas, pirms katra nākamā atšķaidījuma veikšanas mēģenes tika vorteksētas, AB₅ pulveris ātri nosēdās mēģenes apakšā, pirms suspensija tika ar pipeti pārnesta uz nākamo atšķaidījumu. Rezultātā pēdējos atšķaidījumos gandrīz nemaz nebija AB₅ daļiņu, un tas arī var izskaidrot mazāku kolonijas veidojošo vienību skaitu paraugos ar hidrīdus veidojošajiem sakausējumiem – baktērijas nogulsnējās kopā ar metāla daļiņām.

5. tabula

Kolonijas veidojošo vienību skaits barotnēs pēc 24 h kultivēšanas. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅; 4. – *P. putida*, barotne, glicerīns; 5. – *P. putida*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 6. – *P. putida*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅.

Table 5

Colony forming units in growth media after 24 h of cultivation. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy; 4. – *P. putida*, growth medium, glycerol; 5. – *P. putida*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 6. – *P. putida*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy.

Parauga numurs	Kolonijas veidojošo vienību skaits, kvv/mL		
	1. atkārtojums	2. atkārtojums	Vidējā vērtība
1.	6,60 x 10 ⁷	5,70 x 10 ⁷	(6,15 ± 0,64) x 10 ⁷
2.	3,30 x 10 ⁷	2,30 x 10 ⁷	(2,80 ± 0,71) x 10 ⁷
3.	1,58 x 10 ⁷	1,91 x 10 ⁷	(1,75 ± 0,23) x 10 ⁷
4.	0,97 x 10 ⁷	1,53 x 10 ⁷	(1,25 ± 0,40) x 10 ⁷
5.	8,64 x 10 ⁶	7,84 x 10 ⁶	(8,24 ± 0,57) x 10 ⁶
6.	1,44 x 10 ⁷	2,26 x 10 ⁷	(1,85 ± 0,58) x 10 ⁷

3.4. Barotņu hromatogrāfiskā analīze

Lai varētu spriest par metaboliskajiem procesiem barotnē un lai noteiktu metabolizētā glicerīna daudzumu, tika veikta barotņu hromatogrāfiskā analīze (6. tabula).

6. tabula

Barotņu hromatogrāfisko analīžu rezultāti pēc 24 h kultivēšanas. Paraugu sastāvs: 1. barotne; 2. – *E. aerogenes*, barotne; 3. – barotne, jēlglicerīns; 4. – *E. aerogenes*, barotne, jēlglicerīns; 5. – barotne, glicerīns; 6. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 7. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅. nn – nav noteikts.

Table 6

Chromatographic analysis results of growth media after 24 h of cultivation. Components of samples: 1. – growth medium; 2. – *E. aerogenes*, growth medium; 3. – growth medium, crude glycerol; 4. – *E. aerogenes*, growth medium, crude glycerol; 5. – growth medium, glycerol; 6. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 7. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅. nn – not quantified.

Paraugs	Atkārtojums	Koncentrācija, g/L								
		Dzintarskābe	Pienskābe	Skudrskābe	Etiķskābe	Propionskābe	Izobutanols	n-butanols	Glicerīns	Etanols
1.	1.	0,013	nn	0,068	0	nn	0,098	nn	0	nn
	2.	0,018	0,018	0,067	0	nn	0,078	nn	0	nn
2.	1.	0,036	0,020	0,064	0,079	nn	0,167	nn	0	nn
	2.	0,060	0,008	0,090	0,085	nn	0,122	nn	0	nn
3.	1.	0,016	nn	0,031	0	nn	0,086	nn	2,003	nn
	2.	0,014	nn	0,063	0,011	nn	0,072	nn	2,013	nn
4.	1.	0,050	nn	0,077	0,015	nn	0,138	nn	1,501	nn
	2.	0,196	nn	0,147	0,082	nn	nn	nn	nn	nn
5.	1.	0,024	nn	0	0,009	nn	0,050	nn	3,208	nn
	2.	0,016	nn	0,059	0,007	nn	0,050	nn	3,214	nn
6.	1.	0,046	nn	0,076	0,017	nn	0,070	nn	2,632	nn
	2.	0,049	0,134	0,072	0,016	nn	0,080	nn	2,608	nn
7.	1.	0,034	0,170	0,080	0,021	nn	0,100	nn	2,956	nn
	2.	0,041	0,175	0,070	0,021	nn	0,080	nn	2,901	nn

Iegūtie rezultāti uzrāda dzintarskābes, skudrskābes un etiķskābes klātbūtni barotnē, kas bija paredzams, jo šīs vielas ir *Enterobacter aerogenes* glicerīna anaerobās fermentācijas produkti (1. attēls).

Tika konstatēta arī pienskābes un izobutanola klātbūtne. Lai arī *E. aerogenes* nepieder pie pienskābes baktērijām, ir informācija par atsevišķu *E. aerogenes* celmu, piemēram, HU-101 (Rachman et al. 1997) un ATCC 29007 (Thapa et al. 2017) spēju producēt pienskābi. Par *E. aerogenes* spēju ražot izobutanolu informācijas trūkst. Ar gēnu inženierijas palīdzību ir radīti mikroorganismi, kas ir spējīgi veikt izobutanola producēšanu, taču dabā tikai daži mikroorganismi spēj ražot izobutanolu nelielos daudzumos (Felpeto-Santero et al. 2015).

Dzintarskābe, skudrskābe, etiķskābe, pienskābe un izobutanols tika konstatēti arī paraugos, kas baktērijas nesaturēja, liekot apšaubīt hromatogrāfijas rezultātu ticamību. Iegūto rezultātu ticamību liek arī apšaubīt mērījumos noteiktā vidējā glicerīna koncentrācija 5. paraugā (3,21 g/L), kam būtu jābūt 6 g/L, jo paraugs nesaturēja *E. aerogenes*, un netika konstatēta arī izteikta gāzes izdalīšanās un palielināts H₂ procentuālais daudzums šajā paraugā.

Paraugi ar *E. aerogenes*, barotni, glicerīnu un LaNi₅ sakausējumu uzrādīja palielinātu vidējo glicerīna koncentrāciju (2,93 g/L) salīdzinājumā ar paraugu bez LaNi₅ (2,62 g/L), kas apstiprina pēc gāzu analīzēm konstatēto LaNi₅ inhibējošo ietekmi uz glicerīna fermentāciju.

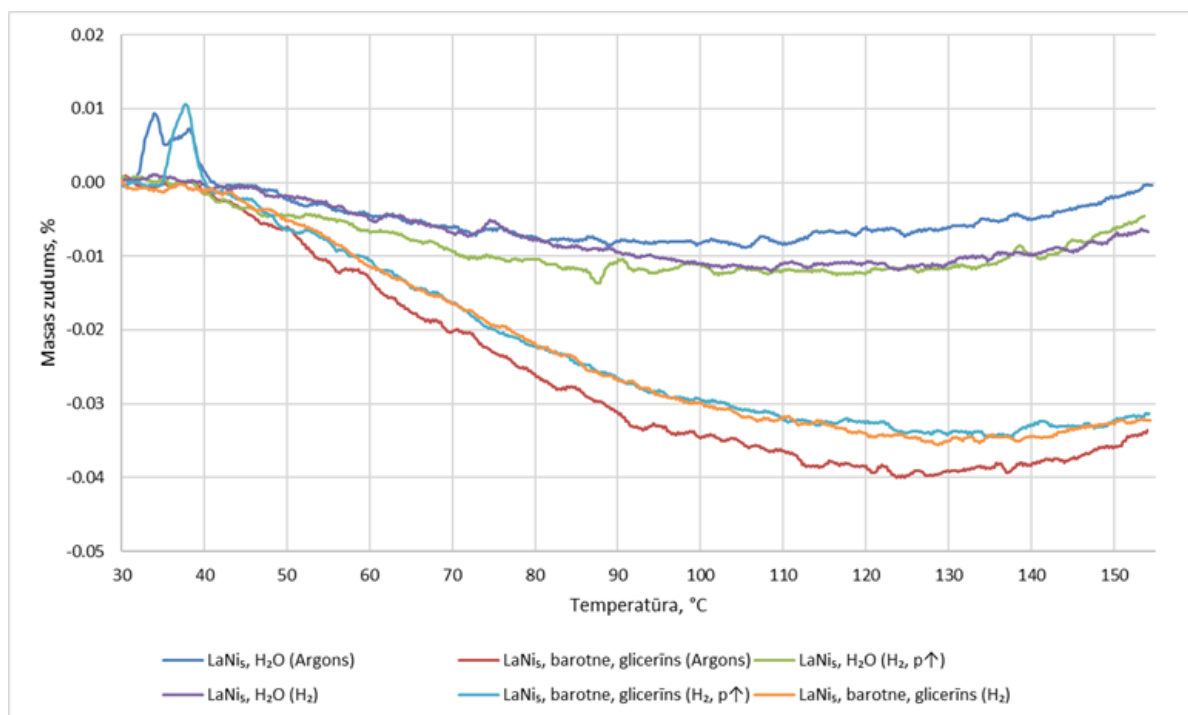
Pēc iegūtās glicerīna koncentrācijas tika izrēķināts ūdeņraža produkcijas aptuvenais iznākums. No sākotnējās glicerīna koncentrācijas (6 g/L) atņēma vidējo glicerīna koncentrāciju 6. paraugā ar *E. aerogenes*, barotni un glicerīnu pēc inkubācijas (2,62 g/L). Ieguva, ka uz litru barotnes eksperimentā tika metabolizēti 3,38 gramu glicerīna. Tā kā ūdeņradis izdalījās arī 2. paraugā, kas glicerīnu nesaturēja, no izdalītā ūdeņraža tilpuma 6. paraugā (5,22 mL) atņēma izdalīto ūdeņraža tilpumu 2. paraugā (0,83 mL) un rezultātu pārrēķināja uz litru barotnes. Ieguva, ka metabolizējot glicerīnu, paraugos uz 1 L barotnes izdalījās 0,13 L ūdeņraža. No iegūtajām vērtībām izrēķināja ūdeņraža produkcijas aptuveno iznākumu – 0,15 moli ūdeņraža uz molu glicerīna, kas ir diezgan zems iznākums. Iepriekšējos pētījumos (Dimanta 2015) šim pašam *E. aerogenes* celmam LMKK 758 tika iegūts iznākums 0,24 moli ūdeņraža uz molu glicerīna (paraugā ar analītisko glicerīnu pie koncentrācijas 15 g/L). Jitrwung un Yargeau (2011), izmantojot *E. aerogenes* ATCC 35029, ieguva ūdeņraža produkcijas iznākumu 0,85 mol/mol. Pēc glicerīna anaerobās fermentācijas shēmas (1. attēls) teorētiski maksimālais iznākums ir 1 mol/mol.

Glicerīna koncentrācija pētījumā izmantotajā jēlglicerīnā, kas tika iegūts no SIA Bio-Venta, nebija zināma. Tā kā jēlglicerīna koncentrācija 3. paraugā, kas nesaturēja *E. aerogenes*, bija 6 g/L, un ar hromatogrāfiskajām analīzēm noteiktā vidējā glicerīna koncentrācija šajā paraugā bija 2,01 g/L, var secināt, ka glicerīna saturs izmantotajā jēlglicerīnā ir 33,5%.

3.5. Termogravimetrija

Sākotnējos eksperimentos paraugos ar LaNi_5 , barotni, glicerīnu un *E. aerogenes* ieguva termogravimetrisko masas zudumu LaNi_5 pulverim no 0,06% līdz 0,16% (karsējot LaNi_5 līdz 155°C). Tomēr paraugi, kas nesaturēja *E. aerogenes*, arī uzrādīja ievērojamu masas zudumu – no 0,08% līdz 0,12%. Turpmākajos eksperimentos tika pārbaudīta dažādu faktoru (spiediena barotnes gāzes fāzē un pH) ietekme uz termogravimetrisko masas zudumu LaNi_5 pulverim.

Barotņu inkubācijas laikā *E. aerogenes* izdala gāzes hermētiski noslēgtās seruma pudelēs, rezultātā paaugstinot tajās spiedienu. Lai noskaidrotu, vai paaugstināts spiediens ietekmē termogravimetrisko masas zudumu LaNi_5 pulverim, veica eksperimentu (9. attēls), kurā paraugiem netika pievienotas baktērijas, kas varētu izmianīt gāzes sastāvu un spiedienu, un daļā paraugu tika nodrošināts paaugstināts argona vai H_2 spiediens. Pusē paraugu LaNi_5 pulveris atradās pudelē kopā ar barotni un glicerīnu, pārējos paraugos ar ūdeni. Metāla sakausējuma pulveris pēc izņemšanas un barotnes un skalošanas ar ūdeni tika žāvēts ledusskapī 7 stundas.



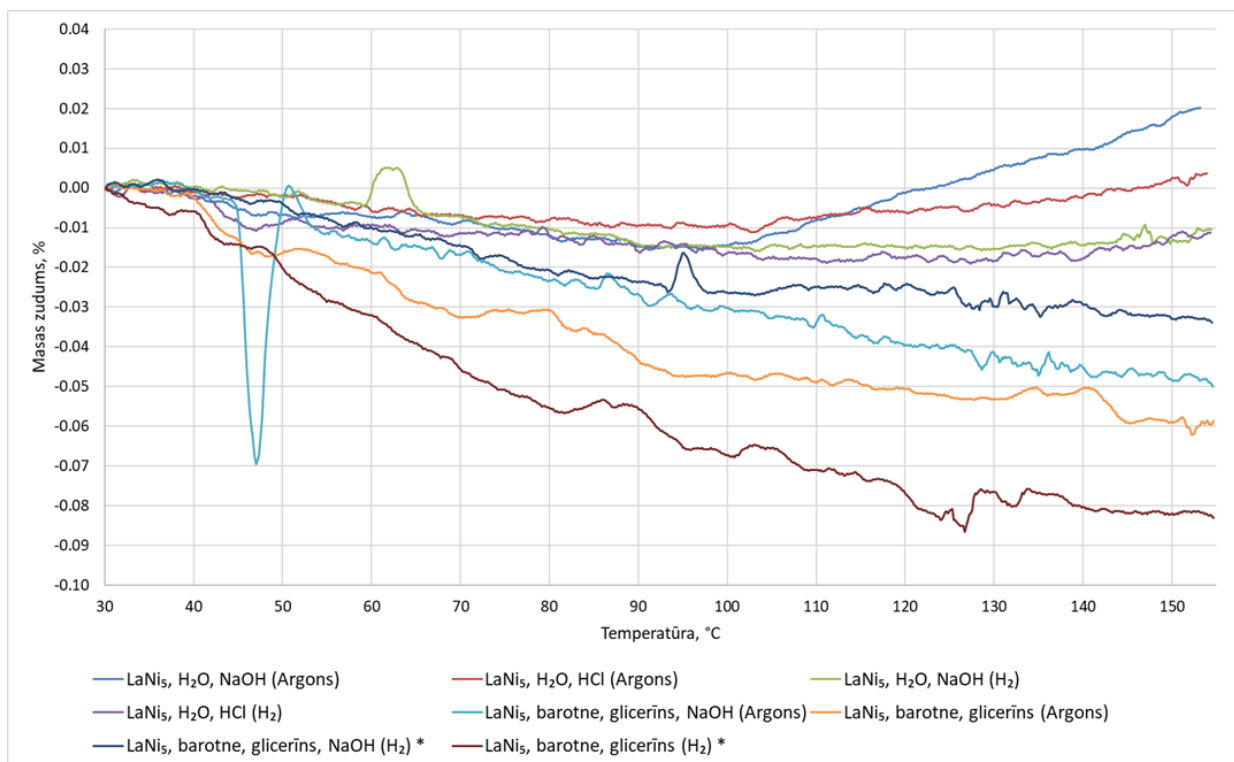
9. attēls. Termogravimetriskais LaNi_5 sakausējuma masas zudums (% no kopējās masas), karsējot paraugu līdz 155°C . (Argons) – pudele izpūsta ar argonu. (H_2) – pudele izpūsta ar ūdeņradi. ($p\uparrow$) – pudelē paaugstināts spiediens.

Figure 9. Thermogravimetric mass loss of LaNi_5 alloy (% of total mass) in temperature up to 155°C . (Argons) – bottle flushed with argon gas. (H_2) – bottle flushed with hydrogen gas. ($p\uparrow$) – elevated pressure in bottle.

Iegūtie termogravimetrijas rezultāti neuzrāda pamanāmu ietekmi uz LaNi₅ masas zudumu ne paaugstinātam spiedienam, ne tam, ar kādu gāzi (argonu vai H₂) tika izpūsta pudele, kur atradās metāla sakausējums. Tomēr izteikta ietekme ir novērojama tam, vai LaNi₅ bija pudelē ar barotni un glicerīnu vai pudelē ar ūdeni – abu paraugu grupu vidējo termogravimetrisko masas zudumu starpība eksperimenta beigās bija 0,029%. Iegūtie rezultāti liecina, ka pat pēc noskalošanas ar ūdeni LaNi₅ pulverī paliek glicerīns vai vielas no barotnes, kas karsēšanas laikā izdalās, samazinot LaNi₅ pulvera masu.

E. aerogenes savā anaerobajā metabolismā rada dažādas organiskās skābes, kas samazina vides pH, ko arī apstiprina iepriekšējo pētījumu pH mērījumi šai pašai barotnei (Valucka 2015). Lai noskaidrotu vides pH ietekmi uz LaNi₅ termogravimetrisko masas zudumu, tika veikts eksperiments (10. attēls), kurā LaNi₅ pulveris bija pudelē kopā ar HCl šķīdumu ūdenī (pH 4,7), NaOH šķīdumu ūdenī (pH 7,7), barotni ar glicerīnu (pH 5,8) vai barotni ar glicerīnu un NaOH (pH 7,8). LaNi₅ paraugi pēc skalošanas ar ūdeni tika žāvēti 1 stundu.

Iegūtie rezultāti uzrāda nelielu pH ietekmi uz LaNi₅ termogravimetrisko masas zudumu paraugos, kur LaNi₅ atradās ar argonu izpūstās pudelēs kopā ar barotni un glicerīnu – pH samazināšanās palielināja masas zudumu par aptuveni 0,01%. Iespējams, NaOH pievienošana barotnei padara to vieglāk noskalojamu, samazinot LaNi₅ termogravimetrisko masas zudumu. Pārējie paraugi nesniedza pārlicinošus rezultātus par pH ietekmi, jo paraugos ar LaNi₅, barotni un glicerīnu, kas tika izpūsti ar ūdeņradi, tika konstatēta baktēriju kontaminācija (barotnes kļuva necaurspīdīgākas, tumšākas un izdalīja gāzi), ko, visticamāk, izraisīja nepietiekama adatu sterilizācija paraugu izpūšanai ar H₂. Paraugi ar LaNi₅ un ūdeni, kas tika izpūsti ar H₂, savstarpēji maz atšķīrās, savukārt paraugi, kas tika izpūsti ar argonu, līdz 100°C uzrādīja nelielu masas zuduma starpību, bet, turpinot paraugus karsēt, rezultāti uzrādīja masas pieaugumu. Lai pārlicinoši spriestu par pH ietekmi uz termogravimetrisko masas zudumu LaNi₅ pulverim, nepieciešami papildus eksperimenti.

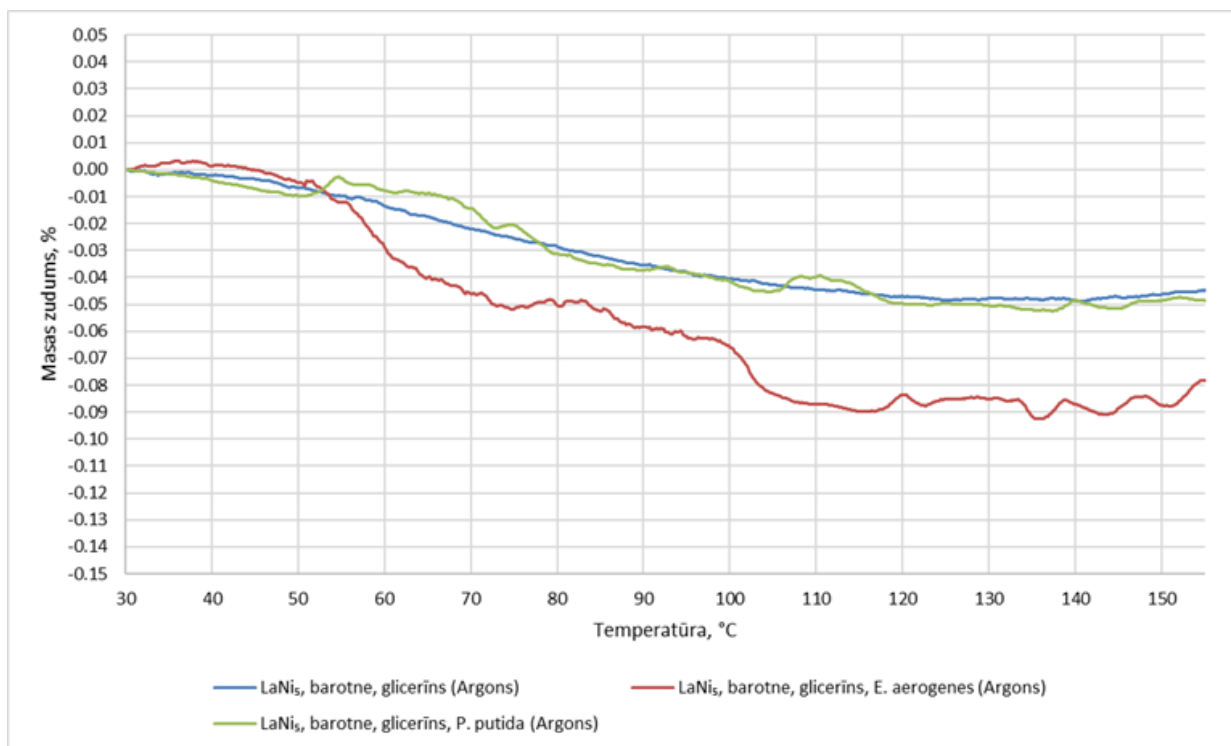


10. attēls. Termogravimetriskais LaNi₅ sakausējuma masas zudums (% no kopējās masas), karsējot paraugu līdz 155°C. (Argons) – pudele izpūsta ar argonu. (H₂) – pudele izpūsta ar ūdeņradi. * – paraugs kontaminēts.

Figure 10. Thermogravimetric mass loss of LaNi₅ alloy (% of total mass) in temperature up to 155°C. (Argons) – bottle flushed with argon gas. (H₂) – bottle flushed with hydrogen gas. * – sample contaminated.

Elektronmikroskopijas attēli (2. attēls), parāda, ka pat pēc noskalošanas ar ūdeni pētījumā izmantotās baktērijas ir sastopamas uz metāla hidrīdus veidojošo sakausējumu daļiņu virsmas. Lai noteiktu, vai baktēriju klātbūtne LaNi₅ pulverī palielina termogravimetrisko masas zudumu, karsējot paraugu, tika veikts eksperiments (11. attēls), kurā LaNi₅, atradās barotnē kopā ar *Pseudomonas putida*, kas ūdeņradi anaerobos apstākļos neproducē. Šajā paraugā ūdeņradis nevarēja būt saistījies metāla hidrīdu veidā un izdalījies parauga karsēšanas laikā, radot masas zudumu. Šajā eksperimentā LaNi₅ paraugi pēc skalošanas ar ūdeni tika žāvēti 12 stundas istabas temperatūrā.

Iegūtie rezultāti neuzrāda izteiktu ietekmi *Pseudomonas putida* klātbūtnei paraugā uz LaNi₅ termogravimetrisko masas zudumu – paraugs ar LaNi₅, barotni, glicerīnu un *P. putida* eksperimenta beigās uzrādīja tikai aptuveni par 0,003% lielāku masas zudumu par paraugu bez baktērijām.



11. attēls. Termogravimetriskais LaNi₅ sakausējuma masas zudums (% no kopējās masas), karsējot paraugu līdz 155°C. (Argons) – pudele izpūsta ar argonu.

Figure 11. Thermogravimetric mass loss of LaNi₅ alloy (% of total mass) in temperature up to 155°C. (Argons) – bottle flushed with argon gas.

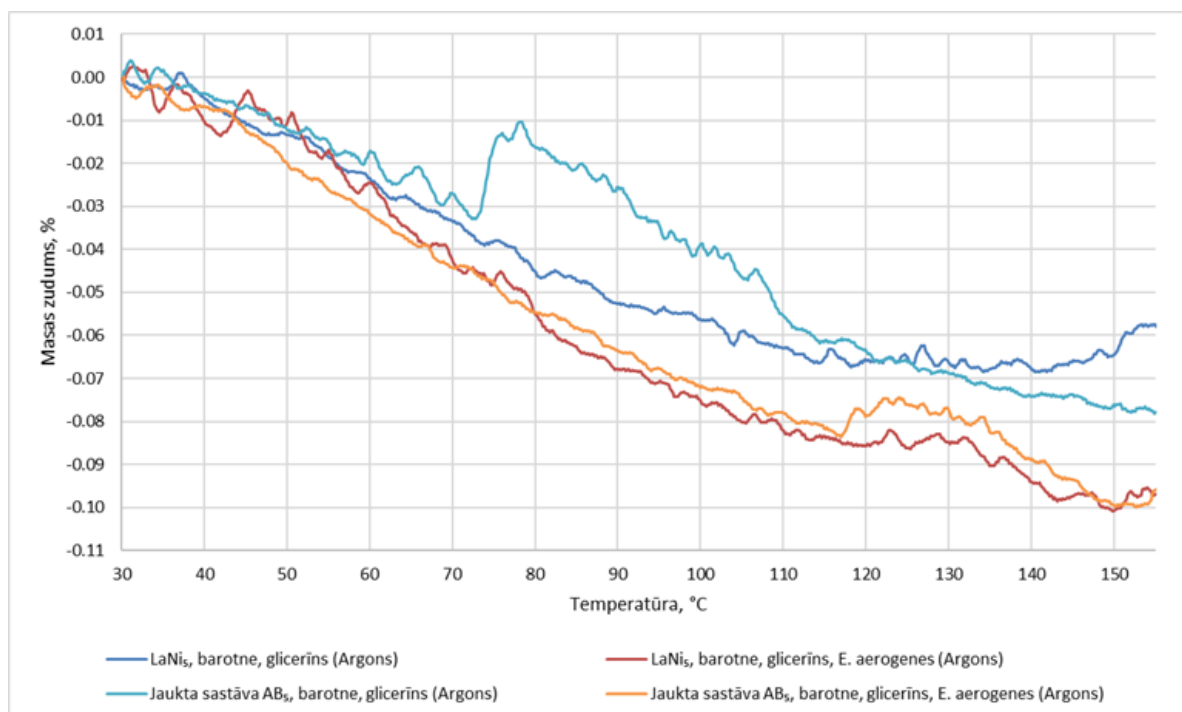
Pēc rezultātiem var secināt, ka maksimālais termogravimetriskais masas zudums, ko varēja būt izraisījusi ūdeņraža izdalīšanās, paraugu karsējot, ir aptuveni 0,0389% – atšķirība starp *E. aerogenes* un *P. putida* paraugu pie 150°C. Iegūtais rezultāts ir daudz zemāks par literatūras datus minēto 1,8% ūdeņraža kapacitāti (Matar 2010).

Tā kā paraugiem tika pievienots 1 grams LaNi₅ sakausējuma, var aprēķināt, ka maksimāli iespējamā hidrīdu veidā saistītā ūdeņraža masa šajā eksperimentā ir 0,389 mg, kas atbilst 4,32 mL ūdeņraža pie 0°C un 101,325 kPa. Diemžēl šim konkrētajam eksperimentam nebija izdevušies masspektrometrijas mērījumi, kas neļauj salīdzināt pēc masspektrometrijas rezultātiem noteikto izdalītā ūdeņraža tilpuma samazināšanos LaNi₅ ietekmē ar iegūto 4,32 mL vērtību. Rezultātu salīdzināšanu arī apgrūtinātu konstatētā LaNi₅ inhibējošā ietekme uz gāzu produkciju. Lai varētu ticami spriest par hidrīdu veidā saistītā ūdeņraža masu, jāveic karsēšanas laikā izdalīto gāzu sastāva mērījumi.

Vienā no eksperimentiem (12. attēls) tika salīdzināts termogravimetriskais masas zudums LaNi₅ un jaukta sastāva AB₅ pulverim. Paraugi pēc noskalošanas tika žāvēti 1 stundu. Iegūtie rezultāti neuzrādīja atšķirību masas zudumā starp LaNi₅ un jaukta sastāva AB₅ pulveri paraugos ar barotni, glicerīnu un *E. aerogenes*. Noteiktais maksimālais termogravimetriskais masas

zudums paraugā ar jaukta sastāva AB₅ sakausējumu, barotni, glicerīnu un *E. aerogenes* – 0,101%. Iegūtā masas zuduma vērtība bija mazāka par iepriekšējos pētījumos (Dimanta et al. 2016) iegūtajiem jaukta sastāva AB₅ sakausējuma termogravimetriskā masas zuduma rezultātiem pēc barotnes 24 stundu inkubācijas, fermentējot jēlglicerīnu ($0,38 \pm 0,16\%$).

Dimanta et al. (2016) salīdzināja arī pallādija (Pd), LaNi₅, AB₅ un AB₂ sakausējuma termogravimetrisko masas zudumu pēc 72 stundu inkubācijas barotnē ar jēlglicerīnu un *E. coli*. Vislielākais saistītā H₂ daudzums tika notekts pallādijs, kam sekoja AB₅, AB₂ un LaNi₅. Veicot karsēšanas laikā no AB₅ sakausējuma izdalīto gāzu masspektrometrisko analīzi pēc inkubācijas barotnē ar jēlglicerīnu un *E. coli*, konstatēja H₂, kā arī nelielu O₂, CO₂ un H₂O izdalīšanos no parauga.



12. attēls. Termogravimetriskais LaNi₅ un jaukta sastāva AB₅ sakausējuma masas zudums (% no kopējās masas), karsējot paraugu līdz 155°C. (Argons) – pudele izpūsta ar argonu.

Figure 12. Thermogravimetric mass loss of LaNi₅ and multicomponent AB₅ alloy (% of total mass) in temperature up to 155°C. (Argons) – bottle flushed with argon gas.

Vienādu paraugu termogravimetriskais masas zudums dažādās eksperimenta veikšanas reizēs ļoti variēja. Viens izskaidrojums tam varētu būt dažāds gaisa mitrums paraugu žāvēšanas un uzglabāšanas laikā. Paraugu žāvēšanas un uzglabāšanas ilgums pirms mērījumiem arī atšķīrās starp eksperimenta veikšanas reizēm – lai paraugs tiktu izžāvēts, žāvējot ar ventilatoru, pietika ar 1 stundu, bet vairākās eksperimenta veikšanas reizēs paraugi pirms

termogravimetrijas veikšanas tika pa nakti uzglabāti ledusskapī, kas tika darīts, jo viena parauga termogravimetriskie mērījumi aizņēma aptuveni 1 stundu – ja paraugu skaits bija liels, bija grūtības 1 dienas laikā paspēt veikt gan masspektrometrijas, gan termogravimetrijas mērījumus. Termogravimetriskie mērījumi arī bija ļoti jutīgi pret vibrācijām telpā, kurā atradās termogravimetrs. Lielākas vibrācijas telpā izraisīja augšup vai lejup vērstus pīķus termogravimetriskā masas zuduma grafikos.

4. SECINĀJUMI

1. Glicerīna pievienošana barotnēm statistiski būtiski ($p < 0,05$) par 276,9% palielināja *E. aerogenes* izdalītā ūdeņraža daudzumu inkubācijas laikā.
2. Pētījumā izmantotā LaNi_5 sakausējuma pievienošana izmainīja glicerīnu saturošas barotnes sastāvu, statistiski būtiski ($p < 0,05$) par 67,3% samazinot ūdeņraža daudzumu barotnes gāzes fāzē.
3. Jaukta sastāva AB_5 pulvera pievienošana glicerīnu saturošai barotnei statistiski būtiski ($p < 0,05$) par 93,9% palielināja ūdeņraža daudzumu barotnes gāzes fāzē.
4. Iegūtais ūdeņraža produkcijas iznākums bija 0,15 moli ūdeņraža uz molu metabolizētā glicerīna.
5. Ūdeņraža saistīšanās metāla hidrīdu veidā, barotnēm pievienojot AB_5 tipa sakausējuma pulveri, netika pārliecinoši konstatēta.
6. Kultivēšanas laikā notika barotnes sastāvdaļu un baktēriju šūnu adsorbcija uz LaNi_5 daļiņām.
7. Maksimālais iegūtais LaNi_5 sakausējuma termogravimetriskais masas zudums, ko varēja būt izraisījusi ūdeņraža izdalīšanās, bija 0,039%.

5. PATEICĪBAS

Paldies darba vadītājai Vizmai Nikolajevai par iespēju izstrādāt darbu un atbalstu tā veikšanas procesā.

Paldies Artūram Grudulam par palīdzību termogravimetrijas eksperimentos, par palīdzību iegūto rezultātu interpretēšanā un par elektronmikroskopijas bildēm.

Paldies Laimonim Jēkabsonam par palīdzību darbā ar masspektrometru.

Paldies Ritai Ščerbakai par hromatogrāfijas rezultātiem.

Paldies Zaigai Petriņai par palīdzību, strādājot laboratorijā.

Paldies darba recenzentei Ilzei Dimantai.

Darbs izstrādāts ar Latvijas Zinātnes Padomes sadarbības projekta Nr. 666/2014 atbalstu.

6. LITERATŪRAS SARAKSTS

Atlas R. M., Bartha R. 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 4th ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings, 640 pp.

Azwar M. Y., Hussain M. A., Abdul-Wahab A. K. 2014. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. – *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31: 158–173.

Balat H., Kirtay E. 2010. Hydrogen from biomass—present scenario and future prospects. – *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 7416–7426.

Cardoso V., Romão B. B., Silva F. T., Santos J. G., Batista F. R., Ferreira J. S. 2014. Hydrogen Production by Dark Fermentation. – *Chemical Engineering Transactions*, 38: 481–486.

Chandrasekhar K., Lee Y. J., Lee D. W. 2015. Biohydrogen production: Strategies to improve process efficiency through microbial routes. – *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4): 8266–8293.

Clomburg J. M., Gonzalez R. 2013. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. – *Trends in Biotechnology*, 31(1): 20–28.

Davin-Regli A., Pagès J.-M. 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. – *Frontiers in Microbiology*, 6: 392.

Dimanta I. 2015. Biohydrogen production from crude glycerol, lactose and hydrogen storage possibilities with metalhydrides from fermentation broth. Promocijas darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 126. lpp.

Dimanta I., Kleperis J., Nakurte I., Valucka S., Nikolajeva V., Rutkovska Z., Muiznieks I. 2016. Metal hydride alloys for storing hydrogen produced by anaerobic bacterial fermentation. – *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(22): 9394–9401.

Felpeto-Santero C., Rojas A., Tortajada M., Galan B., Ramon D., Garcia J. L. 2015. Engineering alternative isobutanol production platforms. – *AMB Express*, 5(1): 1-9.

Garlapati V. K., Shankar U., Budhiraja A. 2016. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. – *Biotechnology Reports*, 9: 9–14.

Garrity G., Staley J. T., Boone D. R., De Vos P., Goodfellow M., Rainey F. A., Schleifer K. H. 2006. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria*. East Lansing, MI: Springer, 1203 pp.

Jitrwung R., Yargeau V. 2011. Optimization of media composition for the production of biohydrogen from waste glycerol. – *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(16): 9602-9611.

Machida A., Honda M., Hattori T., Sano-Furukawa A., Watanuki T., Katayama Y., Aoki K., Komatsu K., Arima H., Ohshita H., Ikeda K., Suzuya K., Otomo T., Tsubota M., Doi K., Ichikawa T., Kojima Y., Kim D. Y. 2012. Formation of NaCl-type monodeuteride LaD by the disproportionation reaction of LaD₂. *Physical Review Letters*, 108(20): 205501.

Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edition. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 992 pp.

Matar S. F. 2010. Intermetallic hydrides: a review with ab initio aspects. – *Progress in Solid State Chemistry*, 38(1): 1-37.

Rachman M. A., Furutani Y., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N. 1997. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. – *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(4): 358-363.

Rajalakshmi N., Dhathathreyan K. S., Ramaprabhu S. 2000. Investigation of a novel metal hydride electrode for Ni-MH batteries. – In: Catherine E., Padro E.G., Lau F. (ed.), *Advances in hydrogen energy*, New York, Springer Science+Business Media: 121–130.

Sakintuna B., Lamari-Darkrim F., Hirscher M. 2007. Metal hydride materials for solid hydrogen storage: a review. – *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(9): 1121–1140.

Srinivasan S. S., Sharma P. C., Stefanakos E. K., Goswami D. Y. 2014. Metal hydrides. In: Sherif S. A., Goswami D. Y., Stefanakos E. K., Steinfeld A. (ed.), *Handbook of hydrogen energy*, Boca Raton, CRC Press: 667–682.

Suleman F., Dincer I., Agelin-Chaab M. 2016. Comparative impact assessment study of various hydrogen production methods in terms of emissions. – *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(19): 8364-8375.

Thapa L. P., Lee S. J., Park C, Kim S. W. 2017. Production of L-lactic acid from metabolically engineered strain of *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007. – *Enzyme and Microbial Technology*, 102: 1-8.

Valucka S. 2015. Ūdeņraža mikrobioloģiska producēšana tumsas fermentācijā un uzkrāšana metālhidrīdos. Maģistra darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 54 lpp.

Wiberg E., Wiberg N., Holleman A. F. 2001. *Inorganic chemistry*. San Diego, CA: Academic Press, 1884 pp.

Yang F., Hanna M. A., Sun R. 2012. Value-added uses for crude glycerol – a byproduct of biodiesel production. – *Biotechnology for Biofuels*, 5(1): 13.

Yokoi H., Ohkawara T., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y. 1995. Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. – Journal of Fermentation and Bioengineering, 80(6): 571–574.

Zuttel A. 2003. Materials for hydrogen storage. – Materials Today, 6(9): 24–33.

Zuttel A. 2004. Hydrogen storage methods. – Naturwissenschaften, 91(4): 152–157.

PIELIKUMI

Gāzes fāzes sastāvs (%) barotnēs pēc 24 h kultivēšanas. Atkārtojumi 1. – 5. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅; 5. – barotne, glicerīns; 6. – barotne, glicerīns, LaNi₅.

Gas phase composition (%) of growth media after 24 h of cultivation. Repetitions 1. – 5. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy; 5. – growth medium, glycerol; 6. – growth medium, glycerol, LaNi₅.

Atkārtojums	Parauga numurs	Gāzes sastāvs, %					
		Ar	H ₂	CO ₂	O ₂	N ₂	H ₂ O
1.	1.	63,6	10,2	5,5	2,9	14,1	3,5
	3.	79,5	1,5	4,2	1,9	9,6	3,3
	5.	67,7	0,1	0,8	5,0	23,7	2,7
	6.	64,2	0,1	0,8	5,6	26,7	2,7
2.	1.	83,4	6,2	8,0	0,3	1,0	0,8
	2.	69,9	13,9	14,7	0,2	0,5	0,6
	3.	87,7	0,3	5,2	1,0	5,2	0,6
	5.	89,1	0,1	1,9	1,5	7,0	0,4
	6.	90,0	0,0	1,5	1,4	6,6	0,4
3.	2.	64,8	17,2	16,3	0,0	0,1	0,6
	3.	76,7	9,5	12,1	0,0	0,4	0,7
	6.	88,6	0,0	0,5	1,6	8,7	0,5
4.	2.	64,6	15,4	18,0	0,4	0,6	0,4
	3.	74,9	9,2	14,1	0,1	0,8	0,4
	5.	92,8	0,0	1,9	0,9	3,8	0,3
	6.	94,4	0,1	1,7	0,5	2,7	0,4
5.	2.	64,8	14,9	16,3	0,0	2,2	0,4
	3.	69,5	4,3	11,4	0,8	13,2	0,7
	5.	83,1	0,1	0,9	2,6	12,9	0,4
	6.	73,9	0,1	0,8	4,4	20,5	0,5

Gāzes fāzes sastāvs (%) barotnēs pēc 24 h kultivēšanas. Atkārtojumi 6. – 9. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅; 5. – barotne, glicerīns; 6. – barotne, glicerīns, LaNi₅.

Gas phase composition (%) of growth media after 24 h of cultivation. Repetitions 6. – 9. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy; 5. – growth medium, glycerol; 6. – growth medium, glycerol, LaNi₅.

Atkārtojums	Parauga numurs	Gāzes sastāvs, %					
		Ar	H ₂	CO ₂	O ₂	N ₂	H ₂ O
6.	1.	83,9	4,9	8,1	0,0	1,0	0,7
	2.	60,9	17,1	19,8	0,0	0,2	0,5
	3.	72,0	3,1	10,8	0,0	12,9	0,8
	5.	93,4	0,1	1,7	0,8	3,5	0,5
7.	2.	59,7	18,2	20,0	0,0	0,0	0,5
	3.	72,2	8,0	13,6	0,0	4,8	0,7
	6.	88,1	0,1	0,5	1,7	9,0	0,7
8.	2.	60,1	17,9	20,3	0,0	0,0	0,6
	3.	70,5	11,8	16,4	0,0	0,0	0,6
	4.	50,5	23,1	25,0	0,0	0,0	0,6
	6.	93,7	0,2	0,7	0,9	4,0	0,6
9.	2.	65,3	15,4	17,1	0,0	0,0	0,5
	3.	70,1	13,0	15,4	0,0	0,0	0,6
	4.	52,3	22,7	23,5	0,0	0,0	0,5
	5.	95,4	0,1	0,4	0,6	2,9	0,5
	6.	96,0	0,1	0,4	0,5	2,3	0,7

Izdalītās gāzes tilpums (mL) pēc 24 h kultivācijas. Atkārtojumi 1. – 5. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅; 5. – barotne, glicerīns; 6. – barotne, glicerīns, LaNi₅.

Gas production volume (mL) after 24 h of cultivation. Repetitions 1. – 5. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy; 5. – growth medium, glycerol; 6. – growth medium, glycerol, LaNi₅.

Atkārtojums	Parauga numurs	Izdalītās gāzes tilpums, mL
1.	1.	4,0
	2.	11,0
	3.	0,0
	5.	0,0
	6.	0,0
2.	1.	5,0
	2.	11,0
	3.	0,0
	5.	0,0
	6.	0,0
3.	2.	13,0
	3.	4,0
	6.	0,0
4.	2.	15,0
	3.	8,0
	5.	1,5
	6.	1,5
5.	2.	13,0
	3.	5,0
	5.	0,0
	6.	2,0

4. pielikums

Izdalītās gāzes tilpums (mL) pēc 24 h kultivācijas. Atkārtojumi 6. – 9. Paraugu sastāvs: 1. – *E. aerogenes*, barotne; 2. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns; 3. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, barotne, glicerīns, jaukta sastāva AB₅; 5. – barotne, glicerīns; 6. – barotne, glicerīns, LaNi₅.

Gas production volume (mL) after 24 h of cultivation. Repetitions 6. – 9. Components of samples: 1. – *E. aerogenes*, growth medium; 2. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol; 3. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, LaNi₅; 4. – *E. aerogenes*, growth medium, glycerol, multicomponent AB₅ alloy; 5. – growth medium, glycerol; 6. – growth medium, glycerol, LaNi₅.

Atkārtojums	Parauga numurs	Izdalītās gāzes tilpums, mL
6.	1.	2,0
	2.	15,5
	3.	6,5
	5.	0,5
7.	2.	17,5
	3.	9,0
	6.	1,5
8.	2.	19,5
	3.	12,5
	4.	26,0
	6.	1,5
9.	2.	17,0
	3.	9,0
	4.	26,5
	5.	0,5
	6.	0,0

Ūdeņraža procentuālā daudzuma paraugā ar barotni, glicerīnu un *E. aerogenes* saistība ar spektrofotometriski noteikto paraugam pievienotās baktēriju suspensijas absorbciju pie viļņu garuma 540 nm. Baktēriju suspensija pirms mērījumiem atšķaidīta 1/10.

Percentage of hydrogen in sample with growth medium, glycerol and *E. aerogenes* in relation to spectrophotometrically measured absorbance of added bacterial suspension at wavelength of 540 nm. Before measurements bacterial suspension was diluted 1/10.

Baktēriju suspensijas absorbcija	H ₂ daudzums paraugā ar barotni, glicerīnu un <i>E. aerogenes</i> , %
0,014	14,9
0,063	18,2
0,073	15,4
0,145	17,1
0,223	17,9
0,302	15,4

Bakalaura darbs „Ūdeņraža mikrobioloģiska producēšana, izmantojot *Enterobacter aerogenes*, un uzkrāšana AB₅ tipa sakausējumā” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Matīss Paiders

01.06.2017

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai.

01.06.2017

Vadītājs: Dr. biol., asoc. prof. Vizma Nikolajeva

Recenzents: Dr. biol. Ilze Dimanta

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē.

01.06.2017

Metodiķis:

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē.

08.06.2017.

prot. Nr. _____, vērtējums _____

Komisijas sekretārs: