

УДК 541.136

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ ЭКЗОГЕННЫХ РЕДОКС-МЕДИАТОРОВ В БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ГЛЮКОЗА–КЛЕТКИ *ESCHERICHIA COLI*-МЕДИАТОР

И. А. Казаринов, Е. В. Кузьмичева, А. А. Игнатова

Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Россия

E-mail: kazarinovIA@info.sgu.ru

Поступила в редакцию 24.03.2011 г.

Методом вращающегося дискового электрода оценена эффективность работы редокс-медиаторов (метиленового синего, нейтрального красного и галлоцианина) в биоэлектрохимической системе глюкоза – клетки *Escherichia coli*-медиатор. Определены коэффициенты диффузии исследуемых медиаторов. Показано, что эффективными обратимыми переносчиками электронов при работе биоанода на основе клеток *Escherichia coli* являются редокс-медиаторы метиленовый синий и галлоцианин.

Ключевые слова: микробный электрокатализ, биоанод, медиатор, микроорганизмы, окисление, восстановление.

The performance of several redox mediators (methylene blue, neutral red, and gallocyanine) in the bioelectrochemical system glucose–*Escherichia coli* cells was estimated by means of the rotating disk electrode technique. The diffusion coefficients of the mediators under study were evaluated. Methylene blue and gallocyanine are shown to be effective reversible electron carriers for the *Escherichia coli*-based bioanode.

Key words: microbial electrocatalysis, bioanode, mediator, microorganisms, oxidation, reduction.

ВВЕДЕНИЕ

При исследовании поведения микроорганизмов в электрохимических системах было обнаружено, что может иметь место перенос электронов от микроорганизма на электрод посредством диффузионно-подвижных промежуточных низкомолекулярных переносчиков электронов – экзогенных медиаторов [1]. Медиаторный механизм транспорта электронов широко используется для проведения электрохимических ферментативных реакций.

В настоящей работе проведено изучение основных закономерностей электрохимического поведения медиаторов – метиленового синего из класса тиазинов, нейтрального красного из класса азинов и галлоцианина из класса оксазинов. Выбор этих медиаторов продиктован их минимальной токсичностью для микроорганизмов *Escherichia coli* и соответствующей величиной их редокс-потенциала [1].

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Клетки *Escherichia coli* штамма К-12 выращивались на твёрдой питательной среде LB с последующим пересевом на жидкую питательную среду LB. Культивирование проводилось в конической колбе на круговой качалке при температуре 37°C в аэробных условиях. После двенадцатичасового культивирования биомассу трижды центри-

фугировали (5000 об/мин, 5 минут) с последующим ресуспензированием в фосфатном буфере (рН 7.0) [2].

Для проведения электрохимических измерений использовалась стеклянная трёхэлектродная ячейка с разделёнными анодным и катодным пространствами, снабжённая наружной стеклянной рубашкой для термостатирования. Эксперименты проводились при температуре 37°C в атмосфере аргона. Вращающиеся дисковые электроды были выбраны в качестве рабочих электродов, которые представляли собой диски из стеклоглуглера площадью 0.071 см². Вспомогательный электрод был выполнен из платиновой проволоки, скрученной в спираль. Потенциометрические измерения проводились относительно насыщенного хлоридносеребряного электрода сравнения, потенциал которого составлял +0.201 В относительно нормального водородного электрода. Рабочим электролитом служил фосфатный буферный раствор с добавкой хлорида натрия в качестве фонового электролита.

В качестве медиаторов применяли окислительно-восстановительные индикаторы – метиленовый синий (чда), нейтральный красный (чда) и галлоцианин (чда). В качестве субстрата был использован моногидрат глюкозы C₆H₁₂O₆·H₂O (хч). Снятие поляризационных кривых и амперометрические измерения проводились с помощью потенциостата IPC-contrast, соединённого с персональным компьютером.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электрохимическое поведение метиленового синего, нейтрального красного и галлоцианина было изучено первоначально с помощью метода циклической вольтамперометрии. Циклические вольтамперные кривые были сняты при различных скоростях вращения на стеклографитовом дисковом электроде для различных концентраций исследуемых медиаторов. В качестве примера на рис. 1–3 приведены циклические вольтамперограммы стеклографитового вращающегося дискового электрода, снятые в рабочем электролите, который содержит в качестве редокс-медиаторов метиленовый синий, нейтральный красный и галлоцианин при различных скоростях вращения дискового электрода. Из циклических вольтамперных кривых видно, что при потенциалах максимума тока катодного восстановления метиленового синего, нейтрального красного и галлоцианина, равных -0.23 , -0.60 и -0.26 В соответственно, величина предельного катодного тока их восстановления зависит от скорости вращения дискового электрода. Анализ зависимости плотности предельного тока процессов восстановления исследуемых медиаторов при различных концентрациях от корня квадратного из скорости вращения дискового электрода показал, что электрохимические реакции восстановления исследуемых медиаторов на электроде протекают в режиме диффузионной кинетики, следовательно, лимитирующей стадией является доставка медиаторов в окисленной форме к поверхности электрода. По уравнению Левича [3], определены коэффициенты диффузии исследуемых медиаторов, которые близки между собой и составляют $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$, $(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}$ и $(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$ $\text{см}^2/\text{с}$ для метиленового синего, нейтрального красного и галлоцианина соответственно. При потенциалах максимума анодного окисления метиленового синего, нейтрального красного и галлоцианина, равных -0.06 , -0.48 и -0.15 В соответственно, величина предельного анодного тока их окисления не зависит от скорости вращения дискового электрода, следовательно, лимитирующая стадия не связана с подводом исследуемых медиаторов в восстановленном состоянии к поверхности электрода. Из циклических вольтамперных кривых для процессов анодного окисления и катодного восстановления исследуемых медиаторов определены значения анодных и катодных электрохимических емкостей (таблица).

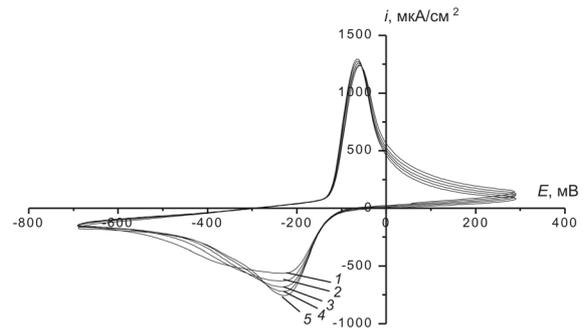


Рис. 1. Циклические вольтамперные кривые стеклографитового вращающегося дискового электрода, снятые в рабочем электролите (рН 7.0), содержащем $1.25 \cdot 10^{-3}$ моль/л метиленового синего и $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы при различных скоростях вращения (рад/с): 1 – 178.0; 2 – 240.6; 3 – 293.1; 4 – 345.2; 5 – 397.6. Скорость развёртки потенциала 10 мВ/с

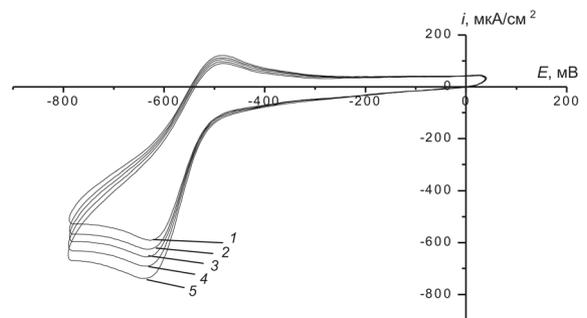


Рис. 2. Циклические вольтамперные кривые стеклографитового вращающегося дискового электрода, снятые в рабочем электролите (рН 7.0), содержащем $1.25 \cdot 10^{-3}$ моль/л нейтрального красного и $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы при различных скоростях вращения (рад/с): 1 – 178.0; 2 – 240.6; 3 – 293.1; 4 – 345.2; 5 – 397.6. Скорость развёртки потенциала 10 мВ/с

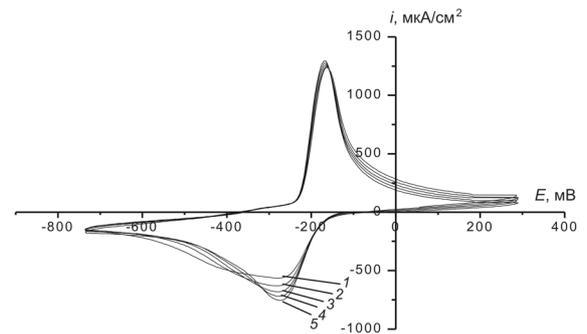


Рис. 3. Циклические вольтамперные кривые стеклографитового вращающегося дискового электрода, снятые в рабочем электролите (рН 7.0), содержащем $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л галлоцианина и $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы при различных скоростях вращения (рад/с): 1 – 178.0; 2 – 240.6; 3 – 293.1; 4 – 345.2; 5 – 397.6. Скорость развёртки потенциала 10 мВ/с

Установлено, что метиленовый синий и галлоцианин на стеклографитовом электроде работают обратимо, а нейтральный красный является необратимо работающим окислительно-

восстановительным медиатором. Об этом также свидетельствует и близость потенциалов анодных и катодных максимумов тока, наблюдавшихся на вольтамперных кривых для метиленового синего и галлоцианина.

Значения анодных и катодных электрохимических ёмкостей, рассчитанных из циклических вольт-амперных кривых для процессов анодного окисления и катодного восстановления метиленового синего, нейтрального красного, галлоцианина в фосфатном буферном растворе на стеклографитовом дисковом электроде при скорости вращения электрода 13.34 рад/с

Концентрация медиатора $C \cdot 10^3$, моль/л	Анодная ёмкость Q_A , мКл	Катодная ёмкость Q_K , мКл
Метиленовый синий		
0.5	12.7	16.1
1.0	13.0	16.4
1.25	16.5	18.2
1.5	18.4	19.4
Нейтральный красный		
0.5	3.3	14.3
1.0	4.1	16.2
1.25	4.4	16.8
Галлоцианин		
0.25	15.5	17.2
0.5	16.0	17.8
0.75	17.0	18.7

Для оценки эффективности работы исследуемых редокс-медиаторов в биоэлектрохимической системе глюкоза – клетки *Escherichia coli* были проведены амперметрические измерения процесса окисления глюкозы бактериальными клетками на вращающемся дисковом электроде при различных концентрациях субстрата и исследуемых медиаторов в рабочем электролите.

На рис. 4 приведены потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на платиновом дисковом электроде при различных скоростях вращения. Видно, что при добавлении бактериальных клеток в рабочий электролит начинается резкое возрастание плотности анодного тока, поскольку происходит увеличение концентрации восстановленной формы метиленового синего в объёме раствора, о чем свидетельствует постепенное обесцвечивание электролита. В данном случае i, t -зависимости проходят через максимум, после чего наблюдается постепенное снижение плотности тока во времени с выходом на постоянное значение, что, по всей видимости, связано со снижением концентрации окисленной формы медиатора в объёме раствора. Величина плотности тока максимума возрастает при увеличении скорости вращения дискового электрода, и общая

скорость процесса зависит от объёмной концентрации медиатора и субстрата в растворе [2].

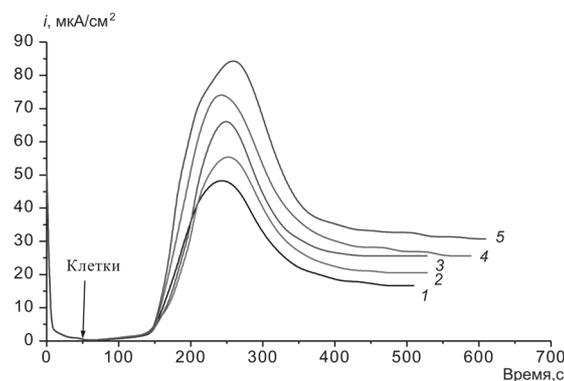


Рис. 4. Потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора, $4.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы и 2 мг вл.массы/мл клеток при различных скоростях вращения (рад/с): 1 – 36.6; 2 – 54.5; 3 – 80.6; 4 – 104.6; 5 – 151.8 при потенциале +0.250 В

Анализ зависимости плотности тока максимума анодного окисления метиленового синего от корня квадратного из скорости вращения дискового электрода для различных концентраций медиатора и глюкозы показал, что процесс окисления метиленового синего на электроде протекает в режиме смешанного диффузионно-кинетического контроля [2]. Это позволило определить кинетические характеристики электродной реакции – порядок реакции p и гетерогенную константу скорости k . Порядок реакции по медиатору и глюкозе равен единице, а среднее значение гетерогенной константы скорости процесса анодного окисления метиленового синего при его различной объёмной концентрации составляет $1.74 \cdot 10^{-3}$ см/с.

На рис. 5 приведены потенциостатические кривые анодного окисления галлоцианина при его различной концентрации на стеклографитовом вращающемся дисковом электроде. Видно, что при добавлении бактериальных клеток в рабочий электролит наблюдается медленное возрастание плотности анодного тока, поскольку происходит увеличение концентрации восстановленной формы галлоцианина в объёме раствора, о чем свидетельствует постепенное обесцвечивание электролита. Плотность тока достигает максимального значения за время 2500–3000 с, что примерно в 10 раз продолжительнее, чем для метиленового синего. При достижении максимальной плотности тока раствор галлоцианина полностью меняет окраску от синей до светло-розовой, что свидетельствует о его полном восстановлении. Из анализа зависимости предельной плотно-

сти тока процесса анодного окисления галлоцианина от корня квадратного из скорости вращения дискового электрода при различной концентрации медиатора видно, что электрохимическая реакция окисления галлоцианина на стеклографитовом электроде протекает в режиме диффузионной кинетики, следовательно, лимитирующей стадией является доставка медиатора в восстановленной форме к поверхности электрода.

На рис. 5 приведены потенциостатические кривые анодного окисления галлоцианина при его различной концентрации на стеклографитовом вращающемся дисковом электроде. Видно, что при добавлении бактериальных клеток в рабочий электролит наблюдается медленное возрастание плотности анодного тока, поскольку происходит увеличение концентрации восстановленной формы галлоцианина в объеме раствора, о чем свидетельствует постепенное обесцвечивание электролита. Плотность тока достигает максимального значения за время 2500-3000 с, что примерно в 10 раз продолжительнее, чем для метиленового синего. При достижении максимальной плотности тока раствор галлоцианина полностью меняет окраску от синей до светло-розовой, что свидетельствует о его полном восстановлении. Из анализа зависимости предельной плотности тока процесса анодного окисления галлоцианина от корня квадратного из скорости вращения дискового электрода при различной концентрации медиатора видно, что электрохимическая реакция окисления галлоцианина на стеклографитовом электроде протекает в режиме диффузионной кинетики, следовательно, лимитирующей стадией является доставка медиатора в восстановленной форме к поверхности электрода.

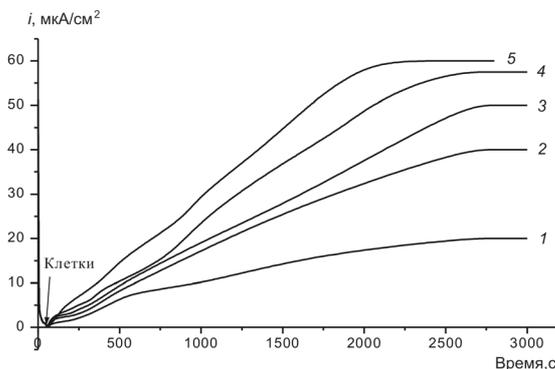


Рис. 5. Потенциостатические кривые анодного окисления галлоцианина на стеклографитовом вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы и 2 мг вл.массы/мл клеток при различной концентрации галлоцианина (моль/л): 1 – $1.25 \cdot 10^{-4}$; 2 – $2.5 \cdot 10^{-4}$; 3 – $5 \cdot 10^{-4}$; 4 – $7.5 \cdot 10^{-4}$; 5 – $1 \cdot 10^{-3}$. Скорость вращения 36.6 рад/с, при потенциале +0.250 В

На рис. 6 приведена потенциостатическая кривая анодного окисления нейтрального красного на стеклографитовом вращающемся дисковом электроде. Видно, что при введении бактериальных клеток в рабочий электролит, не происходит возрастания плотности анодного тока. Это связано, по всей видимости, с неудовлетворительной работой нейтрального красного как медиатора, осуществляющего перенос электронов от микроорганизма на электрод. По имеющимся в литературе сведениям [4], окисленная форма нейтрального красного легко проникает через липидный слой мембраны клетки и взаимодействует с электронами, полученными в результате метаболизма (окисления) глюкозы. Однако выход восстановленной формы медиатора из клетки в электрохимическую систему затруднен, в связи с чем в липидных слоях мембраны бактериальной клетки происходит его накопление.

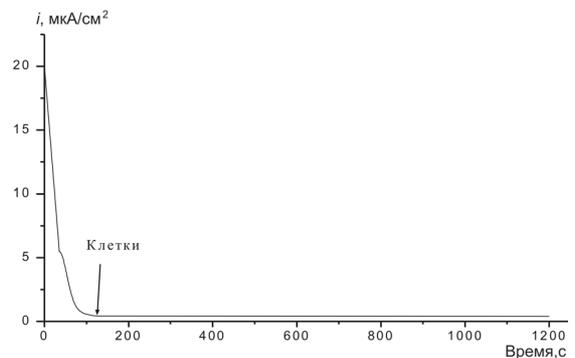


Рис. 6. Потенциостатическая кривая анодного окисления нейтрального красного на стеклографитовом вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л нейтрального красного, $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы и 2 мг вл.массы/мл клеток. Скорость вращения дискового электрода 36.6 рад/с, потенциал +0.250 В

Изучение поведения экзогенных медиаторов в биоэлектрохимической системе показало, что метиленовый синий и галлоцианин являются эффективными окислительно-восстановительными системами в условиях работы микробного медийторного анода на основе клеток *Escherichia coli*.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что электрохимические реакции восстановления исследуемых медиаторов на стеклографитовом электроде в фосфатном буферном растворе (рН 7.0) протекают в режиме диффузионной кинетики. Определены их коэффициенты диффузии, которые близки между собой и составляют $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$ см²/с, $(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}$ см²/с и $(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$ см²/с для метиленового синего,

нейтрального красного и галлоцианина соответственно.

2. Изучено поведение исследуемых медиаторов в биоэлектрохимической системе глюкоза–медиатор–*Escherichia coli* и показано, что метиленовый синий и галлоцианин являются эффективными окислительно-восстановительными медиаторами при реализации микробного медиаторного анода на основе клеток *Escherichia coli*.

3. Показано, что процесс окисления метиленового синего на биоаноде протекает в режиме смешанного диффузионно-кинетического контроля, а процесс окисления галлоцианина – в режиме диффузионной кинетики.

4. Определены кинетические характеристики реакции окисления метиленового синего на биоаноде – порядок реакции и гетерогенная константа скорости. Показано, что порядок реакции по медиатору и глюкозе равен единице, а среднее значение гетерогенной константы скорости процесса

анодного окисления метиленового синего при его различной объёмной концентрации составляет $1,74 \cdot 10^{-3}$ см/с.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России за 2009-2013 годы», государственный контракт № П-2273).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shukla A. K., Suresh P., Berchmans S., Rajendran A. // Current Science. 2004. Vol. 87. P. 455–468.
2. Кузьмичева Е. В., Степанов А. Н., Казаринов И. А., Игнатов О. В. // Электрохим. энергетика. 2007. Т. 7, № 4. С. 200–204.
3. Плесков Ю. В., Филиновский В. Ю. Вращающийся дисковый электрод. М.: Наука, 1972.
4. Choi Y., Kim N., Kim S., Jung S. // Bull. Korean Chem. Soc. Vol. 24, № 4. P. 437–440.