

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физической химии

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО
ОКИСЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ С
ПОМОЩЬЮ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

студентки 4 курса 413 группы
направления 04.03.01 – «Химия»
Институт химии

Мещеряковой Марии Олеговны

Научный руководитель:

д.х.н., профессор

И. А. Казаринов

Зав.кафедрой:

д.х.н., профессор

И .А. Казаринов

Саратов 2016

Введение

Актуальность и цель работы. Сокращение зависимости от ископаемого топлива и снижение загрязнений – это основные тенденции, заставляющие человечество искать новые источники энергии. Обработка сточных вод – область, в которой две эти цели могут быть совмещены.

Начиная со второй половины 20-го века, проблема обработки сточных вод является актуальной для всех стран мира. Утилизируя органическое вещество, которое обычно идет в отходы или теряется в процессах очистки сточных вод, можно получить новый источник электроэнергии. Или же освобождая эту скрытую энергию, которой так богато органическое вещество, в производственных целях, возможно получение биотоплива или чистых химических веществ.

Разные промышленные сточные воды, такие как от пивоваренных заводов, животноводческих ферм и отраслей пищевой промышленности являются идеальным сырьем для биобработки. Они содержат высокие уровни легко деградируемого органического материала, что приводит к экономической выгоде даже когда требуется подогревание жидкости. Такие сточные воды содержат около 17 ГВт мощности энергии.

Кроме того, эти сточные воды уже имеют высокое содержание воды, что исключает необходимость ее добавления. Следовательно, такие сточные воды – потенциальные объекты переработки, из которых можно получать биоэнергию и биохимикаты. Восстановление энергии и ценных продуктов могло бы частично компенсировать стоимость обработки сточных вод и несколько уменьшить нашу зависимость от ископаемого топлива.

Существует несколько биологических стратегий обработки промышленных и сельскохозяйственных сточных вод:

1. очистка сточных вод с помощью микробных топливных элементов (МТЭ);
2. метаногенное анаэробное ферментативное расщепление

органических веществ в сточных водах;

3. ферментативное производство водорода из сточных вод;
4. биологическое химическое производство.

Три из этих стратегий приводят к выработке биоэнергии (электричество, метан, водород), а четвёртая – к ферментативному получению биохимикатов. Однако для внедрения каждой из этих технологий существуют научно-технические проблемы, важнейшей из которых является подбор соответствующих микробиологических систем.

Технологии с использованием микробных топливных элементов, которые могут конвертировать энергию, запасенную в химических связях органических соединениях, в электрическую энергию с помощью ферментативных реакций микроорганизмов, вызывают наибольший интерес в последние десятилетия.

Поэтому **целью работы** является оценка эффективности микроорганизмов *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae*, используемых в качестве биокатализатора в процессе биоэлектрохимического окисления глюкозы, сахарозы и лимонной кислоты в нейтральных средах.

При этом решались следующие **задачи**:

1. Изучение кинетики биоэлектрокаталитического окисления глюкозы с помощью бактериальных клеток *Escherichia Coli* и *Enterobacter cloacae*
2. Сравнение биоэлектрокаталитического окисления разных органических субстратов с помощью бактериальных клеток *Escherichia Coli*

Объём и структура работы. ВКР состоит из введения, трех глав, включая литературный обзор, заключение, техники безопасности и списка цитируемой литературы (26 источников). Работа изложена на 40 страницах машинописного текста, иллюстрирована 12 рисунками и содержит 4 таблицы.

Основное содержание работы

Массоперенос играет важную роль в химических реакциях, поэтому проблемам массопереноса в течение многих лет уделялось большое внимание. В ферментативном катализе проблемы массопереноса начали привлекать внимание исследователей в связи с изучением кинетики действия ферментов и микроорганизмов в электрохимических системах.

С целью изучения кинетики электрохимических процессов, протекающих во внешнедиффузионной цепи, были проведены амперометрические измерения биоэлектрохимического окисления глюкозы бактериальными клетками *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae* на вращающемся дисковом электроде.

В качестве медиатора был использован метиленовый синий из класса фенотиазинов. Выбор указанного медиатора основан, во-первых, на том, что он соответствует практически всем требованиям, предъявляемым экзогенным медиаторам, во-вторых, его электрохимические свойства хорошо нами изучены и, в-третьих, окисленные и восстановленные формы используемого медиатора различаются по цвету, что позволяет визуально оценивать эффективность протекания метаболизма субстрата и электрохимического превращения медиатора.

На рисунке 1 приведены потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на платиновом вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $4.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы, 2 мг вл. веса/мл клеток *Escherichia coli* и $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора при различных скоростях вращения дискового электрода.

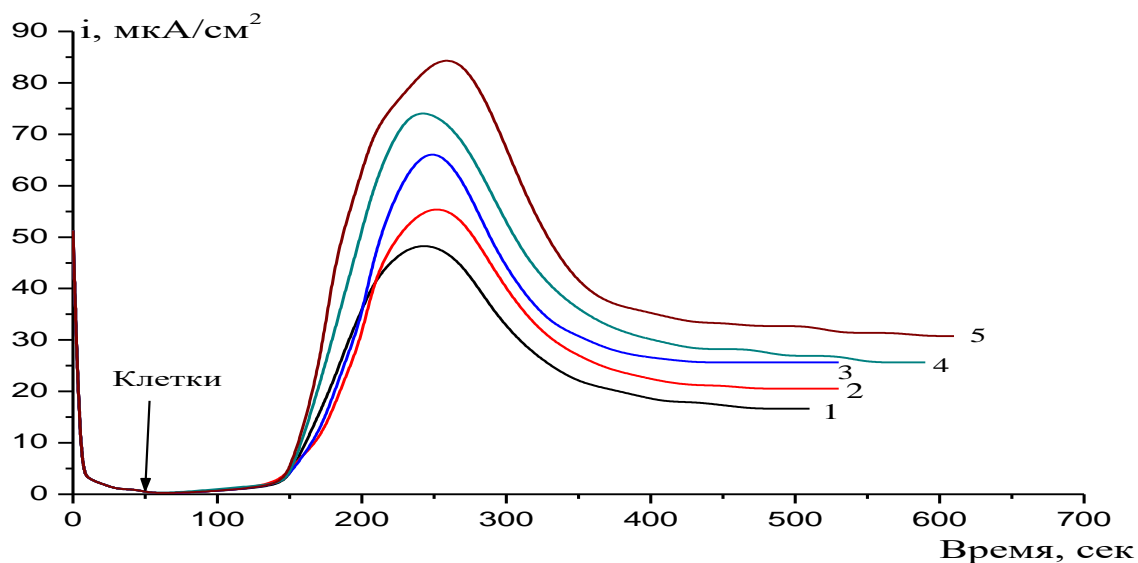


Рисунок 1 - Потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора, $4.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы и 2 мг вл. веса/мл клеток *Escherichia coli* при различных скоростях вращения (рад/с): 1- 36.6; 2-54.5; 3- 80.64; 4- 104.6; 5- 151.8 при потенциале +0.250 В.

На рисунке 2 приведены потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на стеклографитовом вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $4.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы, $1.5 \cdot 10^9$ клеток/мл *Enterobacter cloacae* и $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора при различных скоростях вращения дискового электрода.

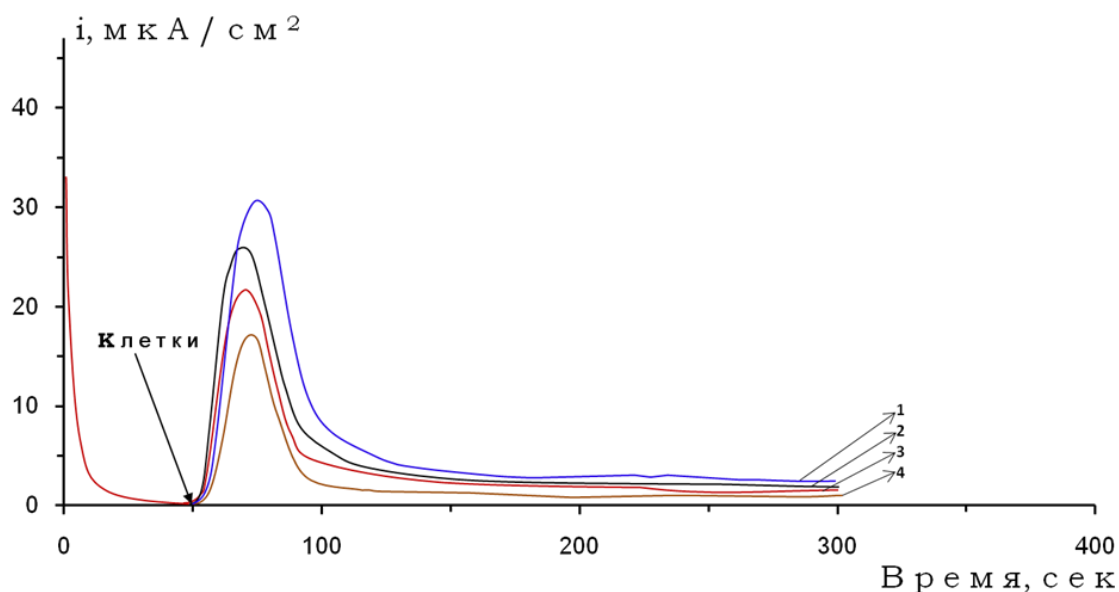


Рисунок 2 - Потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора, $4.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы и $1.5 \cdot 10^9$ клеток/мл *Enterobacter cloacae* при различных скоростях вращения (рад/с): 1- 104.6; 2-177.9; 3- 251.2; 4- 324.5 при потенциале +0.080 В.

Из рисунков 1 и 2 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. Кривые 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 восстановленной формы медиатора в объёме раствора. Величина плотности тока максимума возрастает при увеличении скорости вращения дискового электрода.

На рисунке 3 представлена зависимость плотности предельного тока процесса восстановления метиленового синего клетками *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae* от корня квадратного из скорости вращения дискового электрода.

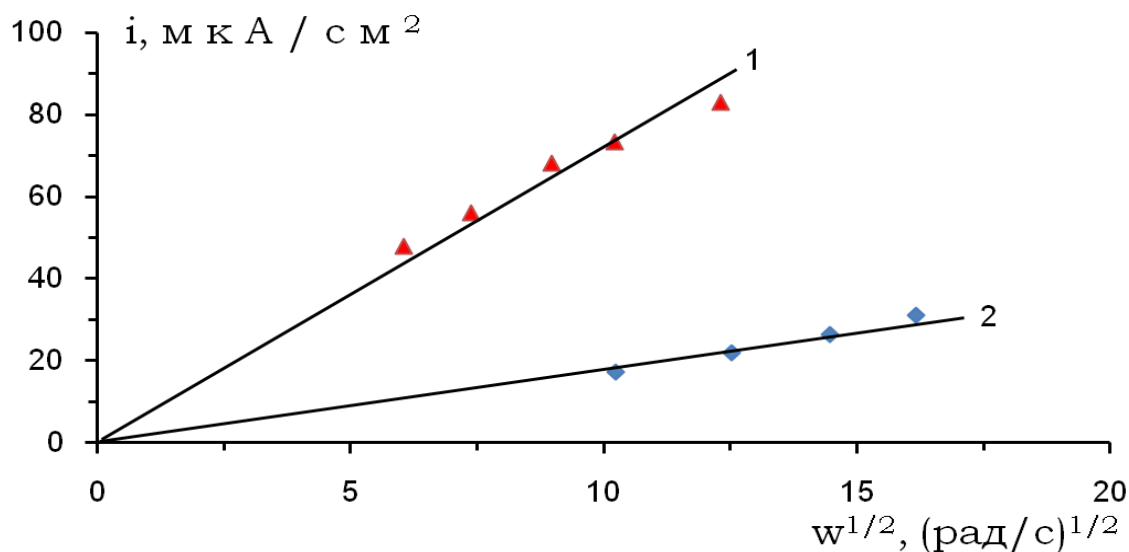


Рисунок 3 - Зависимость плотности тока максимума катодного восстановления метиленового синего клетками *Escherichia coli* (1) и *Enterobacter cloacae* (2) от корня квадратного из скорости вращения дискового электрода.

Как видно из рисунка 3, наблюдается прямая пропорциональная зависимость между плотностью предельного диффузионного тока исследуемого медиатора и корнем квадратным из угловой скорости вращения вращающегося дискового электрода. В этом случае i_d , $\omega^{1/2}$ -кривые легко аппроксимируются прямыми линиями, проходящими через начало координат, что свидетельствует о диффузионной природе процессов восстановления исследуемого медиатора.

Доказанный нами факт, что электрохимическая реакция восстановления метиленового синего из клеток *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae* протекает в режиме диффузионной кинетики дает возможность применить уравнение Левича для определения физико-химической характеристики вещества – коэффициента диффузии исследуемого медиатора в растворе электролита, содержащего бактериальную суспензию.

Таблица 1 - Значения коэффициентов диффузии метиленового синего в растворе электролита содержащего бактериальную суспензию

Клетки	$D_{cp} \cdot 10^7, \text{см}^2/\text{с}$
<i>Escherichia coli</i>	4.5±0.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1.3±0.3

Из полученных данных видно, что значения коэффициентов диффузии метиленового синего в представленных экспериментах зависят от природы бактериальной суспензии, используемой в качестве катализатора процесса окисления глюкозы. Это свидетельствует о том, что мы наблюдаем не внешнедиффузионный (диффузия в объеме электролита), а внутридиффузионный контроль, то есть лимитирующей стадией является перенос медиатора через наружную мембрану бактериальной клетки.

Как видно из полученных данных (см. табл. 1), коэффициент диффузии восстановленной формы метиленового синего из клеток *Escherichia coli* в 3.5 раза выше, чем из клеток *Enterobacter cloacae*. В тоже время эти значение много меньше соответствующей величины в свободном объеме раствора $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$. Это указывает на то, что при подборе микроорганизмов в качестве катализаторов биоэлектрохимического окисления субстратов необходимо учитывать механизм переноса медиатора через клеточную мембрану. По этой причине клетки *Enterobacter cloacae* являются менее эффективным катализатором по сравнению с клетками *Escherichia coli* для биоэлектрохимического окисления глюкозы.

Определившись с эффективным катализатором, мы проводили сравнение биоэлектрокаталитического окисления разных органических субстратов с помощью бактериальных клеток *Escherichia Coli*

В качестве субстратов были выбраны растворы глюкозы, сахарозы и лимонной кислоты, как модели сточных вод от пищевой промышленности.

Циклические вольтамперограммы снимались при одинаковой

скорости перемешивания.

На рисунке 4 представлены вольтамперные кривые фона с добавлением органического субстрата с концентрацией $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

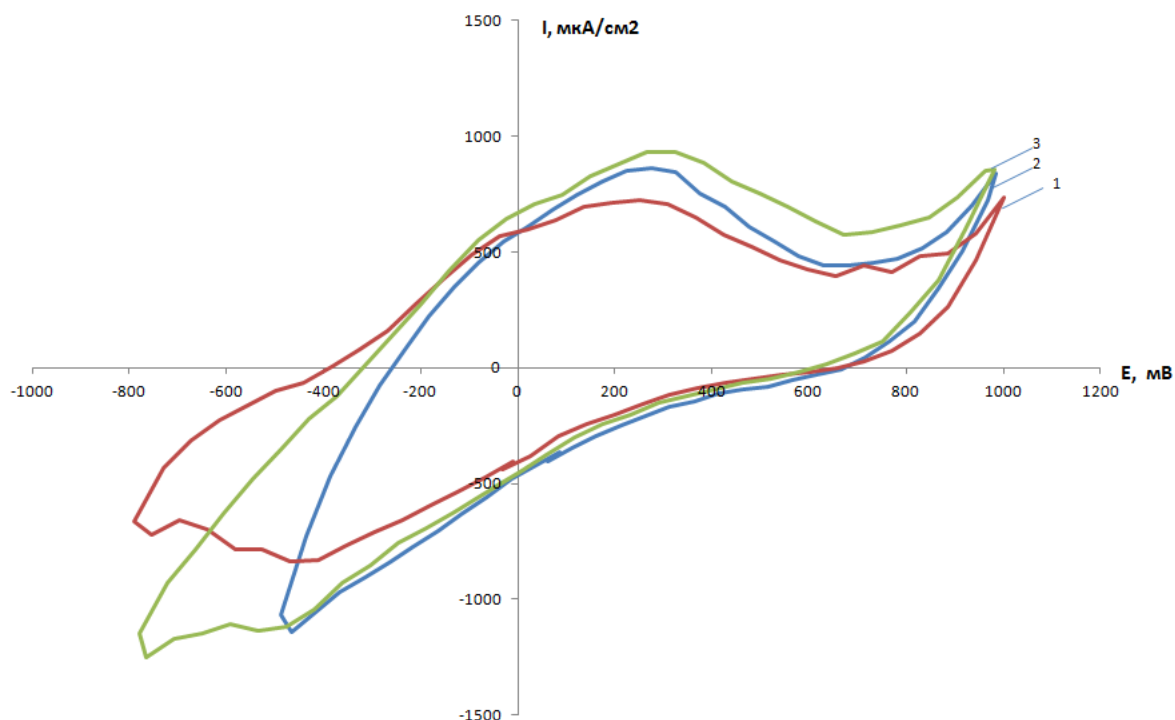
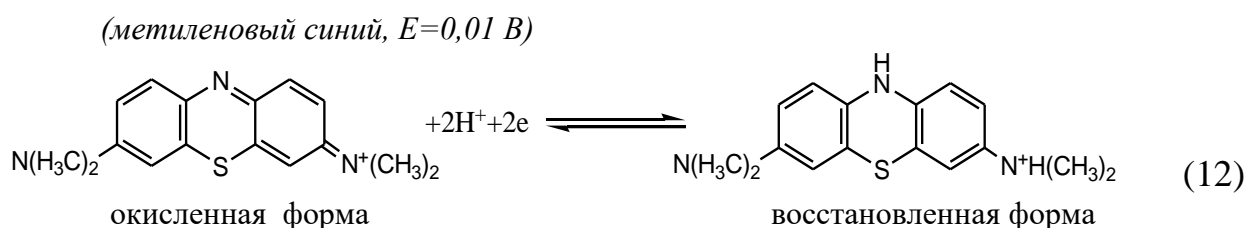


Рис. 4 Циклические вольтамперные кривые углеродистого электрода в рабочем электролите (рН=7.0), содержащем $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л органического субстрата: 1 – глюкоза; 2 – сахароза; 3- лимонная кислота.

При введении в рабочий электролит метиленового синего в анодной области потенциалов появляется анодный пик тока, а в катодной области – катодный ток максимума. Появление анодного пика связано с процессом окисления метиленового синего на электроде, а появление катодного пика связано с его восстановлением по реакции:



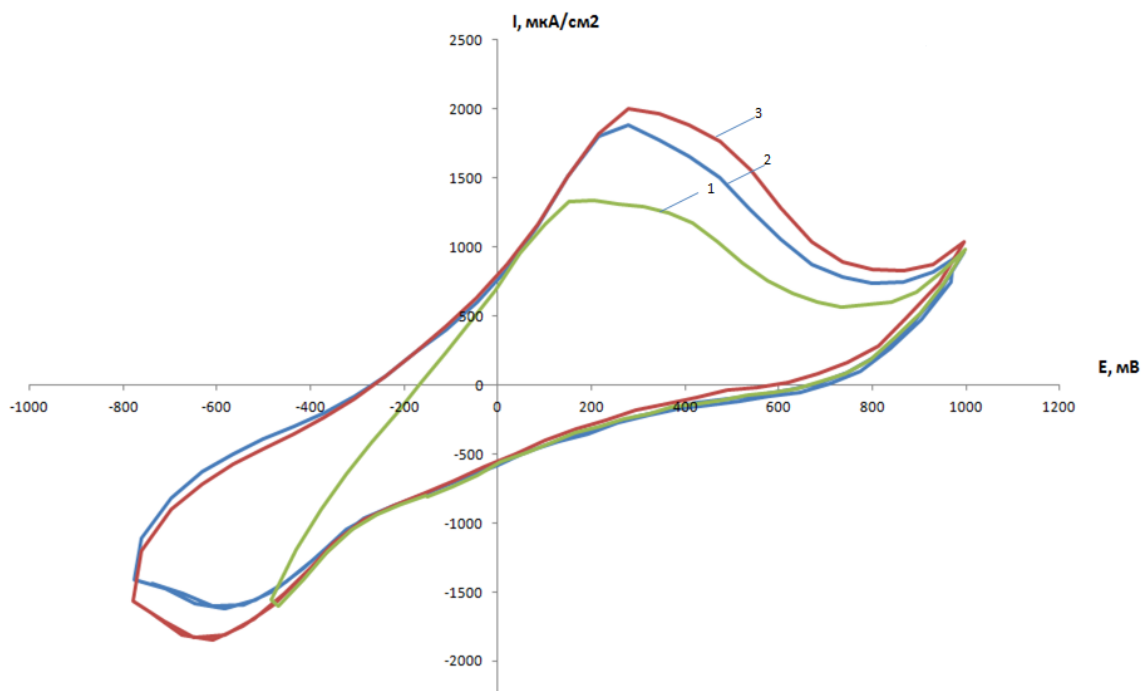


Рисунок 5 – Циклические вольтамперные кривые углеродистого электрода, снятые в рабочем электролите (рН=7.0), содержащем $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы и различные концентрации метиленового синего (моль/л): 1 – $7,5 \cdot 10^{-4}$; 2 – $1 \cdot 10^{-3}$; 3 – $1,5 \cdot 10^{-3}$.

На рисунках 6 – 8 приведены циклические вольтамперные кривые углеродистого электрода, снятые при одинаковой скорости вращения в рабочем электролите (рН=7.0), содержащем $4,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л органического субстрата, $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л раствора метиленового синего и разное количество клеток *Escherichia coli*.

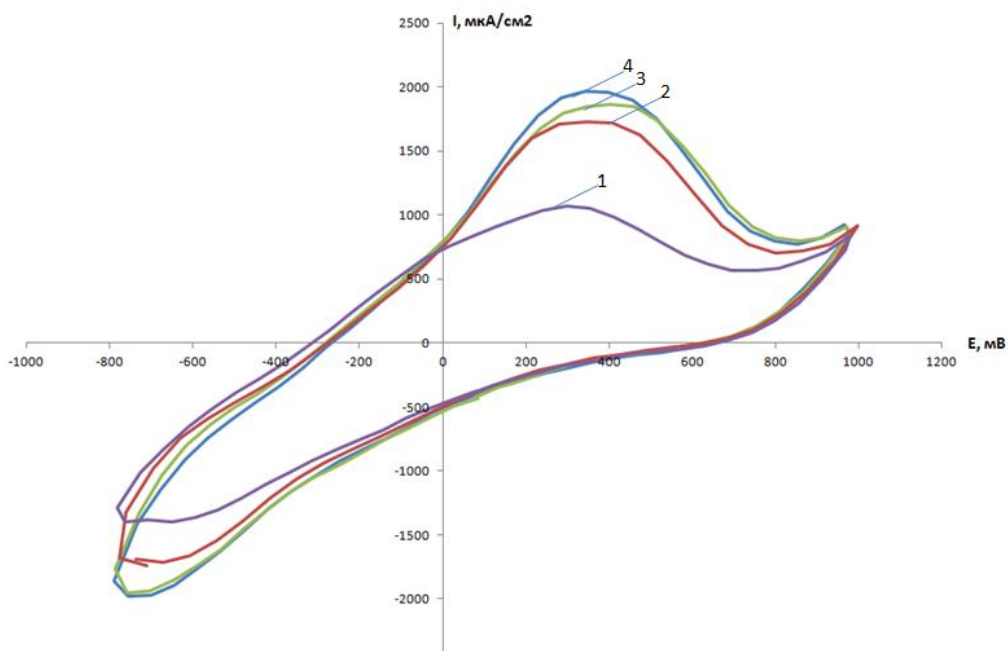


Рисунок 6 – Циклические вольтамперные кривые углеродистого электрода в рабочем электролите (рН=7.0), содержащем $4,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы, $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л раствора метиленового синего и разное количество клеток *Escherichia coli* ($1 \cdot 10^9$ клеток/мл): 1- без добавления; 2 – 1 мл; 3 – 2 мл; 4 – 3 мл.

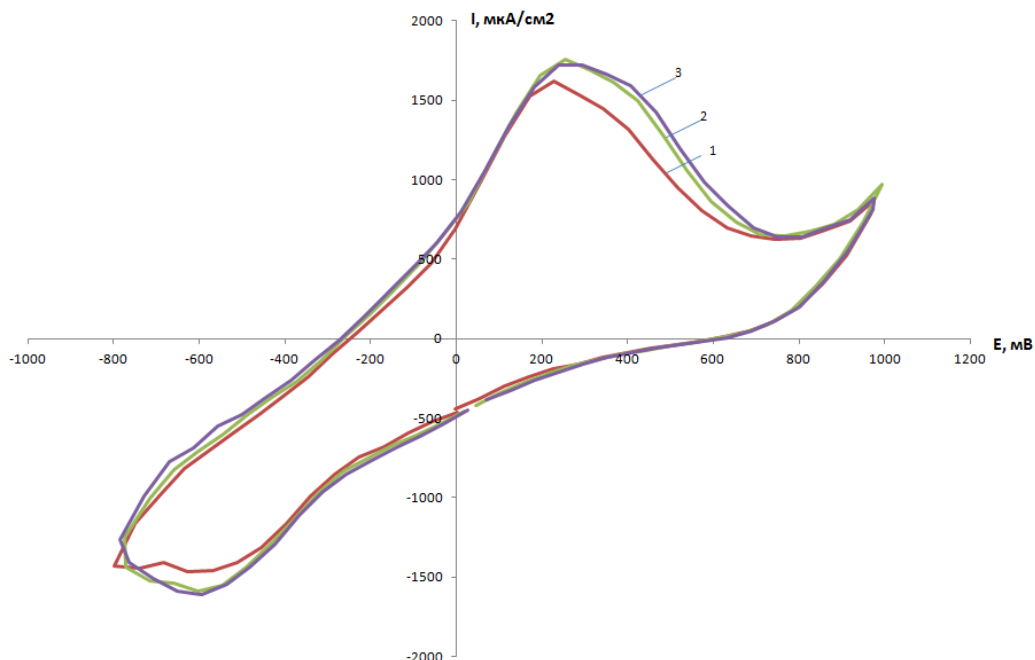


Рисунок 7 – Циклические вольтамперные кривые углеродистого электрода в рабочем электролите (рН=7.0), содержащем $4,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л лимонной кислоты, $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л раствора метиленового синего и разное количество клеток *Escherichia coli* ($1 \cdot 10^9$ клеток/мл): 1- без добавления; 2 – 1 мл; 3 – 2 мл

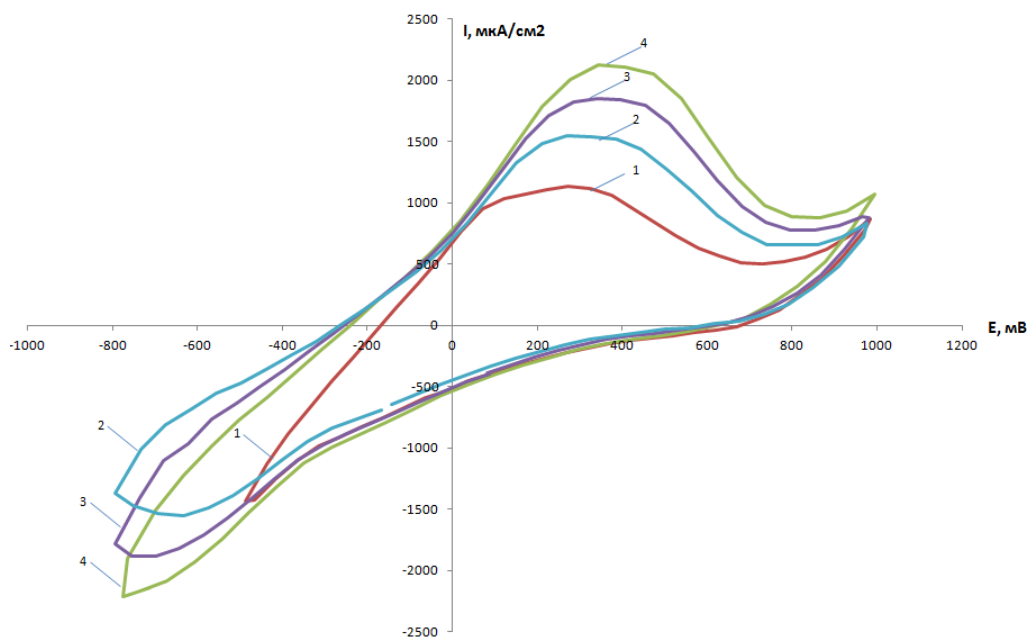


Рисунок 8 – Циклическая вольтамперные кривые углеродитового электрода в рабочем электролите (рН=7.0), содержащем $4,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л сахарозы, $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л раствора метиленового синего и разное количество клеток *Escherichia coli* ($1 \cdot 10^9$ клеток/мл): 1- без добавления; 2 – 1 мл; 3 – 2 мл; 4 – 3мл.

Таким образом, проведенные исследования показали, что скорость биоэлектрохимического окисления исследуемых органических субстратов зависит от концентрации введенного в систему медиатора. При увеличении концентрации бактериальных клеток *Escherichia coli* также наблюдается увеличение плотности тока максимума на вольтамперных кривых. Самое большое увеличение скорости электрохимического окисления при увеличении концентрации клеток наблюдалось в экспериментах, в которых в качестве субстрата использовалась сахароза.

При решении практических задач для повышения эффективности очистки стоков от органических веществ необходима оптимизация биоэлектрохимической системы как по концентрации медиатора, так и по концентрации бактериальных клеток, либо концентрация клеток должна быть в избытке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено поведение исследуемого медиатора в биоэлектрохимической системе «глюкоза – клетки - медиатор – электрод» и показано, что метиленовый синий является обратимым окислительно-восстановительным медиатором и может быть применен при реализации микробного медиаторного анода на основе глюкозы и клеток *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae*.

2. Установлено, что лимитирующей стадией процесса биоэлектрохимического окисления глюкозы в нейтральных средах является диффузия восстановленной формы медиатора (метиленового синего) через клеточную мембрану микроорганизма. Показано, что величина коэффициента диффузии через клеточную мембрану микроорганизмов *Escherichia coli* в 3.5 раза выше, чем для микроорганизмов *Enterobacter cloacae* и, следовательно, клетки *Escherichia coli* являются более эффективным биокатализатором процесса окисления глюкозы.

3. Изучено биоэлектрокаталитическое окисление разных органических субстратов (глюкозы, лимонной кислоты и сахарозы) с помощью бактериальных клеток *Escherichia coli*. Показано, что скорость биоэлектрохимического окисления исследуемых органических субстратов зависит от концентрации введенного в систему медиатора. При увеличении концентрации бактериальных клеток *Escherichia coli* также наблюдается увеличение плотности тока максимума на вольтамперных кривых. Самое большое увеличение скорости электрохимического окисления при увеличении концентрации клеток наблюдалось в экспериментах, в которых в качестве субстрата использовалась сахароза.

4. При решении практических задач для повышения эффективности очистки стоков от органических веществ необходима оптимизация биоэлектрохимической системы как по концентрации медиатора, так и по концентрации бактериальных клеток, либо концентрация клеток должна быть в избытке.