

Мощностные характеристики макета биотопливного элемента на основе метилотрофных бактерий *

С. В. Алферов, О. А. Каманина, П. Р. Минайчева, Н. В. Доронина,
О. Н. Понаморева

Аннотация. Показано, что бактерии *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ₄ в композиции с медиатором 2,6-дихлорфенолиндофенолом (2,6-ДХФИФ) являются эффективным биокатализатором в макете биотопливного элемента (БТЭ) при окислении метанола. Изучено влияние внешнего сопротивления на генерацию ЭДС и силу тока во внешней цепи, проведена оценка внутреннего сопротивления и определена мощность изучаемой модели БТЭ.

Ключевые слова: биотопливный элемент, метилотрофные бактерии, мощность.

Введение

Биотопливный элемент — устройство, которое непосредственно преобразует энергию микробного метаболизма в электричество [1]. Основой БТЭ является биокатализатор, в качестве которого могут выступать целые клетки микроорганизмов [2, 3]. Одним из перспективных биокатализаторов на основе микроорганизмов являются метилотрофные бактерии. Метилобактерии, обладающие функциональным разнообразием, приобретают все большую экологическую значимость, поскольку на фоне кризиса состояния окружающей среды увеличивается число территорий с высоким содержанием токсичных С₁-соединений [4]. Важной особенностью этих бактерий является присутствие в плазматической мембране RQQ-зависимых метанолдегидрогеназ, которые связаны с дыхательной цепью бактерий. Известно, что поверхностная локализация ферментов в мембранах бактериальных клеток облегчает их взаимодействие с медиаторами электронного транспорта [5]. В связи с этим изучение возможности использования метилотрофных бактерий в качестве

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 11-04-97544-р_центр_а).

биокатализаторов в медиаторных биотопливных элементах является актуальной задачей.

В большинстве случаев микроорганизмы являются электрохимически неактивными и не способны прямо передавать электроны на электрод. В этом случае могут быть использованы растворимые вещества, известные как редокс-медиаторы, которые облегчают электронный транспорт и обеспечивают эффективный перенос электронов от микроорганизмов к аноду [1].

При разработке БТЭ важной задачей является достижение наибольшей производительности БТЭ, т.е. оптимизация параметров, влияющих на генерацию потенциала: расстояние между анодом и катодом, скорость переноса электронов от бактерий к аноду посредством медиатора электронного транспорта, концентрация субстрата, производительность катода, температура, ионная сила раствора и другие [4]. Изучение влияния внешнего сопротивления на работу медиаторного микробного биотопливного элемента является необходимым элементом исследований, направленных на увеличение производимой БТЭ мощности.

Цель работы — выявление особенностей биокаталитического окисления метанола в присутствии медиаторов электронного транспорта целыми клетками метилотрофных бактерий с различными путями C_1 -метаболизма *Methylovorus mays* и *Methylobacterium dichloromethanicum* и расчет мощностных характеристик полученного макета биотопливного элемента.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали метилотрофные бактерии *Methylovorus mays* и *Methylobacterium dichloromethanicum* (штаммы предоставлены Дорониной Н.В., ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН), которые различаются внутренними путями C_1 -метаболизма [4], что может влиять на биокаталитические свойства этих бактерий. Штамм *M. mays* реализует рибулозомонофосфатный (РМФ) путь C_1 -метаболизма, а штамм *M. dichloromethanicum* — сериновый.

Культивирование метилотрофных бактерий. Культивирование бактерий проводили на питательной среде «К» следующего состава: KH_2PO_4 — 2,0 г/л, $(NH_4)_2SO_4$ — 2,0 г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,125 г/л, NaCl — 0,5 г/л, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,002 г/л. Культуры микроорганизмов выращивали в колбах объемом 750 мл (объем среды «К» 200 мл) при 29°C и аэрация на шейкере при 190 об/мин. Инокулят вносили в количестве 1% по объему среды до конечной концентрации $\sim 10^6$ КОЕ/мл. Метанол вносили в стерильные среды в концентрации 0,5 % (по объему).

Формирование ячейки биотопливного элемента. Ячейка БТЭ представляла собой две взаимосвязанные кюветы, объем анодного отделения был равен объему катодного и составлял 3 мл. Электродами служили графитовые стержни диаметром 8 мм, площадь рабочей

поверхности электродов составляла 300 мм². Связь кювет осуществлялась через отверстие в стенке диаметром 6 мм. Камеры разделяли протонселективной мембраной, являющейся аналогом мембраны Nafion 117 в протонированной форме [3]. В качестве фонового раствора использовали 30ММ натрий-фосфатный буфер рН 7,2, а в качестве медиатора использовали 2,6-дихлорфенолиндофенол, нейтральный красный, тионин и гексацианоферрат (III) калия с концентрацией в кювете 30 мкМ. В качестве субстрата для окисления клетками использовали метанол с концентрацией в кювете 30 мМ.

Электрохимические измерения. Измерения потенциала проводили с помощью гальванопотенциостата IPC Micro (Россия). Графитовые стержни погружали в электролитическую ячейку. Измерения проводили в буферном растворе с рН 7.2 при постоянном перемешивании раствора магнитной мешалкой. Регистрацию ответов на добавку субстрата в измерительную ячейку начинали после установления стационарного состояния потенциала. Измеряемым параметром в процессе биокаталитического окисления субстрата в режиме генерации потенциала являлась амплитуда генерируемого потенциала за время эксперимента.

Математическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью компьютерных программ Sigma Plot 10.0 и Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Выбор медиатора электронного транспорта проводили, исходя из общих критериев эффективности медиаторов электронного транспорта в микробных биотопливных элементах: способность легко проникать через мембрану клеток и забирать электрон из активных центров ферментов, с последующей передачей его на электрод по цепному механизму; растворимость в анолите; нетоксичность для микроорганизмов. В качестве медиаторов переноса электронов от ферментных систем бактерий на электрод применяли вещества, наиболее часто используемые при разработке БТЭ: 2,6-дихлорфенолиндофенол, тионин, нейтральный красный, гексацианоферрат (III) калия [5].

Оценку эффективности медиатора проводили по величине генерируемого потенциала на аноде при окислении метанола метилобактериями. Величины генерируемых потенциалов приведены в таблице 1.

Отсутствие генерации потенциала в присутствии тионина, возможно, связано с высокой степенью адсорбции этого вещества на мембране бактерий, поверхности анода и протонселективной мембране БТЭ (что препятствует электронному переносу), а также с низкой скоростью электрохимического окисления восстановленной формы тионина [9]. Катц и Шипвей [5] установили, что для тионина предпочтительным является применение его в сочетании с комплексом Fe (III)-ЭДТА. Раствор, содержащий тионин и комплекс Fe (III)-ЭДТА в качестве медиаторов электронного переноса, был

ТАБЛИЦА 1

Величины генерируемых потенциалов в макете биотопливного элемента при использовании различных медиаторов электронного транспорта

Биокатализатор		<i>Methylovorus mays</i>		<i>Methylobacterium dichloromethanicum</i> ДМ4	
Медиатор электронного транспорта	Стандартный потенциал восстановления, мВ	Генерируемый потенциал, мВ	Среднее время генерации потенциала, мин	Генерируемый потенциал, мВ	Среднее время генерации потенциала, мин
2,6-дихлорфенолин-дофенол	+217	140 ± 10 *	310	250 ± 20	160
Нейтральный красный	-330	9 ± 1	30	75 ± 5	85
Гексацианоферрат (III) калия	+361	29 ± 1	10	3,0 ± 0,2	10
Тионин	+64	—	—	—	—

* Каждое измерение проводили 3 раза, статистическую обработку проводили с помощью компьютерной программы Sigma Plot 10.0.

использован для переноса электронов от бактерий *Escherichia coli* к аноду при окислении глюкозы в качестве субстрата. Хотя оба медиатора могут быть восстановлены посредством *E. coli*, тионин восстанавливается более чем в 100 раз быстрее, чем комплекс Fe (III)-ЭДТА. Электрохимическое окисление восстановленного тионина намного медленнее, чем окисление комплекса Fe (II)-ЭДТА, поэтому электроны, полученные при окислении глюкозы в присутствии *E. coli* переносятся главным образом на тионин. Восстановленный тионин быстро окисляется посредством Fe (III)-ЭДТА и восстановленный хелатный комплекс Fe (II)-ЭДТА переносит электроны к аноду посредством электронной реакции Fe (III)-ЭДТА/ Fe (II)-ЭДТА.

При использовании нейтрального красного и гексацианоферрата (III) калия в качестве медиаторов при окислении метанола метиловыми бактериями генерируются невысокие значения потенциалов по сравнению с данными, полученными в работах [8] и [10]. Парк и Зейкус [8] применяли нейтральный красный в сочетании с бактериями *Actinobacillus succinogenes* при окислении метана. При исследовании эффективности переноса электронов в системах на основе бактерий *Escherichia coli* наиболее эффективным медиатором был гексацианоферрат (III) калия при окислении различных спиртов и сахаров [10]. Таким образом, эффективную пару медиатор-биокатализатор нельзя прогнозировать, можно только определить на основе экспериментальных данных. Проведенное нами исследование показало, что бактерии *Methylobacterium dichloromethanicum* в

композиции с медиатором 2,6-дихлорфенолиндофенолом являются наиболее эффективным биокатализатором в макете микробного БТЭ при окислении метанола.

Максимальная мощность, развиваемая БТЭ, достигается при равенстве внутреннего и внешнего сопротивления [11]. Для определения внутреннего сопротивления в изучаемой модели биотопливного элемента на основе бактерий *Methylobacterium dichloromethanicum* и медиатора электронного транспорта 2,6-дихлорфенолиндофенола была изучена зависимость силы тока от приложенного внешнего сопротивления в интервале 0,27–10000 кОм (рис. 1).

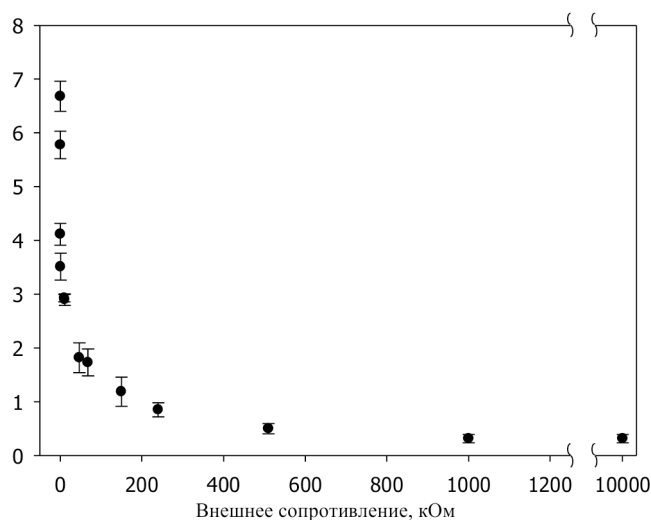


Рис. 1. Зависимость силы тока от внешнего сопротивления при использовании медиатора 2,6-дихлорфенолиндофенола в анодном пространстве

Как можно видеть, в диапазоне приложенного внешнего сопротивления наблюдается падение силы тока в биотопливном элементе. Внутреннее сопротивление биотопливного элемента рассчитывали как:

$$R_{\text{внутр}} = \frac{E_1 - E_2}{I}, \quad (1)$$

где E_1 — ЭДС, генерируемая БТЭ на добавление субстрата, В; E_2 — ЭДС, генерируемая БТЭ при внешнем сопротивлении, В; I — сила тока, А.

Для оценки максимальной мощности использовали метод пика мощности [11], для чего исследовали зависимость мощности БТЭ от внешнего сопротивления (рис. 2).

Максимальная мощность, развиваемая БТЭ, наблюдается при приложенном внешнем сопротивлении 68 кОм: $P_{\text{max}} = 370 \pm 10$ нВт.

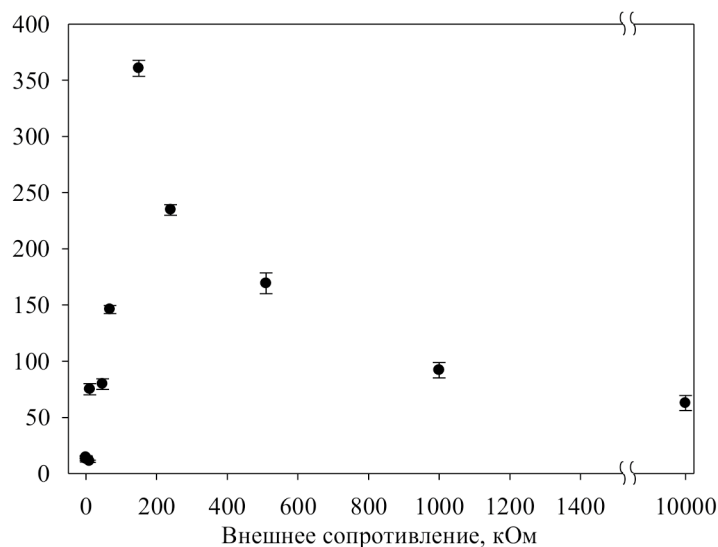


Рис. 2. Зависимость мощности БТЭ от внешнего сопротивления при использовании медиатора 2,6-дихлорфенолиндофенола в анодном пространстве

Значение мощности БТЭ недостаточно полно отражает эффективность изучаемого элемента. Для описания БТЭ и сравнения разработанных моделей между собой используется понятие мощности нормированной к единице поверхности рабочего электрода [11]. Мощность обычно приводят относительно размеров анода — удельная мощность рассчитывается как:

$$P_{An} = \frac{E_{BTЭ}^2}{A_{An} R_{внеш}}, \quad (2)$$

где A_{An} — площадь поверхности анода, $R_{внеш}$ — внешнее сопротивление.

Рассчитанное по формуле (2) значение мощности отнесенной к геометрической поверхности анода составляет $1,2 \text{ мВт/м}^2$, что превышает аналогичные значения для клеток *Glucanobacter oxydans* [13] в 170 раз.

Заключение

В ходе работы было установлено, что наиболее эффективным медиатором в макете биотопливного элемента на основе микроорганизмов *Methylobacterium dichloromethanicum* и *Methylovorus mays* является 2,6-дихлорфенолиндофенол, при этом величины генерируемого потенциала составили $250 \pm 20 \text{ мВ}$ и $140 \pm 10 \text{ мВ}$ соответственно. Показано, что бактерии *Methylobacterium dichloromethanicum* в композиции с медиатором 2,6-ДХФИФ являются наиболее эффективным биокатализатором в макете микробного БТЭ при окислении метанола.

Впервые изучено влияние внешнего сопротивления на генерацию ЭДС и силу тока во внешней цепи биотопливного элемента на основе метиловых бактерий *Methylobacterium dichloromethanicum* при использовании медиатора 2,6-ДХФИФ в анодном отделении. Установлено, что удельная мощность изучаемого макета БТЭ составила 1,20 мВт/м².

Список литературы

1. Казаринов И.А., Кузьмичева Е.В. Микробные топливные элементы — новое направление в развитии альтернативной энергетики // Автономная энергетика. 2009. №26. С.37–47.
2. Дебабов В.Г. Производство электричества микроорганизмами // Микробиология. 2008. Т.77. Вып.2. С.149–157.
3. Logan B.E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells // Nature Rev. Microbiol. 2009. №7. P.375–381.
4. Романовская В.А., Столяр С.М., Малашенко Ю.Р. Систематика метилотрофных бактерий // Киев: Наукова Думка, 1991.
5. Katz E., Shipway A.N., Willner I. Mediated electron-transfer between redox-enzymes and electrode supports // Encyclopedia of Electrochemistry: Bioelectrochemistry. Germany. 2002.
6. Hong Liu, Logan B.E. Power Generation in Fed-Batch Microbial Fuel Cells as a Function of Ionic Strength, Temperature, and Reactor Configuration // Environ. Sci. Technol. 2005. №39. P.5488–5493.
7. Smolander M., Marko-Varga G., Gorton L. Aldose dehydrogenase-modified carbon paste electrodes as amperometric aldose sensors // Anal. Chim. Acta. 1995. №30. P.233–240.
8. Park D.H., Zeikus J.G. Utilization of electrically reduced neutral red by Actinobacillus succinogenes: physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation // Bacteriol. 1999. №18. P.2403–2410.
9. Electrical communication of cytochrome enriched Escherichia coli JM109 cells with graphite electrodes / Sergey Alferov [et al.] // Electrochimica Acta. 2009. №54. P.4979–4984.
10. Duine J.A., Frank J., Ruiters L.S. Isolation of methanol dehydrogenase with a functional coupling to cytochrome c // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 115. P.523–524.
11. Logan E. Microbial fuel cells. John Wiley & Sons, 2008.
12. Davis F., Higonson S. Biofuel cells — recent advances and applications // Biosensors & Bioelectronics. 2007. №22. P.1224–1235.
13. Минайчева П.Р., Алферов С.В. Биотопливный элемент на основе иммобилизованных клеток *Gluconobacter oxydans* // Экотоксикология-2011: матер. Всероссийской конф. с элементами научн. школы для молодежи. Тула: ТулГУ, 2011. С.11–12

Алферов Сергей Валерьевич (dr_alf@rambler.ru), к.х.н., ассистент, кафедры биотехнологии, Тульский государственный университет.

Каманина Ольга Александровна (o.a.kamanina@gmail.com), аспирант, кафедра химии, Тульский государственный университет.

Минайчева Полина Романовна (polina.minaycheva@gmail.com), аспирант, кафедра химии, Тульский государственный университет.

Доронина Нина Васильевна (doronina@ibpm.pushchino.ru), д.б.н., ведущий научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуцдино.

Понаморева Ольга Николаевна (olga@tsu.tula.ru), к.х.н., доцент, кафедра химии, Тульский государственный университет.

Power characteristics of biofuelcell based on methylotrophic bacteria

S. V. Alferov, O. A. Kamanina, P. R. Minaycheva, N. V. Doronina,
O. N. Ponomoreva

Abstract. It is shown that methylotrophic bacteria *Methylobacterium dichloromethanicum DM4* in composition with electron transport mediator 2,6-dichlorophenolindophenol are the efficient biocatalyst in biofuelcell methanol oxidizing. The influence of external resistance on the power generation process in microbial biofuelcell has been studied. The estimation of internal resistance and power output of the investigated biofuelcell model has been made.

Keywords: biofuelcell, methylotrophic bacteria, power.

Alferov Sergej (dr_alf@rambler.ru), candidate of chemical sciences, department of biotechnology, Tula State University.

Kamanina Olga (o.a.kamanina@gmail.com), postgraduate student, department of chemistry, Tula State University.

Minaycheva Polina (polina.minaycheva@gmail.com), postgraduate student, department of chemistry, Tula State University.

Doronina Nina (doronina@ibpm.pushchino.ru), doctor of biological sciences, senior staff research scientist, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of RAS, Pushchino.

Ponomoreva Olga (olga@tsu.tula.ru), candidate of chemical sciences, department of chemistry, Tula State University.

Поступила 15.09.2011