

微生物电极的研制及其阴、阳极反应的研究

杨茂余 杨璋

(南京化工学院应用化学系, 南京)

本文描述了一个用于微生物浓度快速测定的燃料电池型的微生物电极的构造及其基本工作原理。分别用恒电流阴极极化法和旋转圆盘电极恒电位阳极极化法研究了微生物电极的阴极反应和阳极反应, 用分光光度法研究了微生物对染料(硫堇)的还原动力学。结果表明: 以 $K_4Fe(CN)_6-K_3Fe(CN)_6$ 的饱和溶液为阴极液, 在微生物电极的正常工作电流下, 阴极电位基本上不发生极化; 阳极反应受扩散控制; 微生物对染料(硫堇)的还原动力学符合米氏型方程; 溶解氧、微生物的浓度以及微生物对染料的还原能力对染料的还原动力学具有较大的影响。

关键词 微生物测定; 微生物电极; 氧化还原媒介; 硫堇; 酵母; 细菌

由于发酵工业和环境、卫生等部门的需要, 近年来人们陆续开发了一些旨在快速、准确、连续、自动检测微生物的电极系统。这些电极系统主要有 Wilkins^[1-3] 和 Junter^[4,5] 等人的电位测量系统、Matsunaga 等人^[6-9] 的微生物燃料电池系统和恒电位系统等。

电位测量系统一般由测量电极(如 Pt、Au 等)和参比电极(如甘汞电极)组成, 主要是从微生物代谢产生还原性物质引起培养基电极电位的变化来反映微生物浓度的。而 Matsunaga 等人的微生物燃料电池系统则可分为两类: 一类是测量微生物与阳极之间直接进行电子传递所产生的电流的电极系统; 另一类则是以氧化还原染料为电子传递媒介的电极系统。这些电极系统一般都以氧(如 O_2 和 Ag_2O_2 中的 O)为电子受体, 以 2,6-二氯酚靛酚和吩嗪为阳极反应的电子传递媒介。但是, 他们都未对阴极反应和阳极反应作进一步的研究。而恒电位系统, 或是由研究电极、

辅助电极和参比电极构成的单三电极系统, 或是双三电极系统。

本文介绍了作者所研制的以铁氰化钾-亚铁氰化钾的饱和溶液为阴极液、以氧化还原染料硫堇为电子传递媒介的燃料电池型的微生物电极系统, 分析了该微生物电极的工作原理, 并对其阴、阳极反应进行了研究。

材料和 方法

(一) 微生物电极的研制

图 1 是微生物电极的示意图。它主要由阳极、阴极、阳离子交换膜、阳极液、阴极液和外测量线路等部分组成。阳离子交换膜和阳极通过环氧树脂分别与有机玻璃圆筒侧边和底面相粘结。

(二) 研究阴、阳极反应的实验装置及方法

1. 主要仪器: HDV-7 恒电位仪;

本文于 1987 年 4 月 15 日收到。

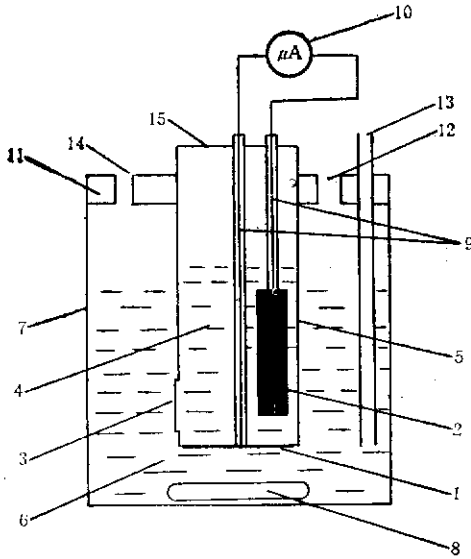


图 1 微生物电极示意图

Fig. 1 Scheme of microbial electrode

1. 阳极 Anode (Pt), $2 \times 3 \text{ cm}^2$
2. 阴极 Cathode (Pt), $1 \times 4 \times 2 \text{ cm}^2$
3. 阳离子交换膜 Cation exchange membrane, $1.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$
4. 阴极液, 饱和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液 Catholyte, saturated $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution
5. 有机玻璃圆筒 Perspex cylinder, 直径 Diameter 3.5cm, 容量 Volume 45ml
6. 阳极液, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 + 氧化还原染料 (硫蓝) + 微生物 Anolyte, 0.1mol/L phosphate buffer + redox dye (thionine) + microorganisms
7. 有机玻璃圆筒 Perspex cylinder, 直径 Diameter 6cm, 容量 Volume 150ml
8. 磁搅拌转子 Magnetic agitating bar
9. 导线 Conductor
10. 微安表 Microammeter
11. 橡皮塞 Rubber joint
12. 进样口 Sample inlet
13. 进气口 Nitrogen inlet
14. 出气口 Nitrogen outlet
15. 有机玻璃盖板 Perspex cap

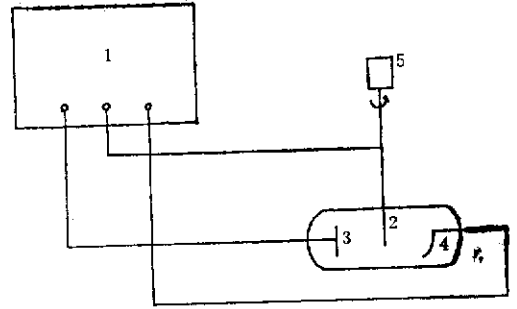


图 2 旋转圆盘电极测量线路

Fig. 2 Determining circuit of rotating disk electrode

1. 恒电位仪 Potentiostat
2. 工作电极 Working electrode (Pt)
3. 辅助电极 Auxiliary electrode (Pt)
4. 饱和甘汞参比电极 Saturated calomel reference electrode
5. 电动机 Motor

(2) 加入一定量的大肠杆菌悬液, 测量电极电位的变化。当硫蓝完全还原后 (此时电极电位基本上稳定在一个较负的数值), 进行下述测量。

(3) 测量 2000、3000 和 4000rpm 三个不同转速时的恒电阳极极化曲线。

(4) 把给定电位置于 +300mV (SCE), 测量不同转速 (500—7000rpm) 下阳极反应的极限扩散电流。

4. 研究阴极反应的测量线路: 基本上与图 2 相同, 只是以平面电极 (Pt) 取代旋转圆盘电极。

5. 研究阴极反应的实验方法及步骤

(1) 用蒸馏水配制 0.01mol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -0.01mol/L $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、0.1mol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -0.1mol/L $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和饱和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 三种溶液。

(2) 分别测量上述三种溶液在除氧 (通 N_2 40min) 与不除氧情况下的恒电流阴极极化曲线。

(三) 研究染料还原动力学的仪器及方法

DW-3 旋转电极 (Pt); DT-830 数字万用表 2 只。

2. 研究阳极反应的旋转圆盘电极测量线路: 如图 2 所示。

3. 研究阳极反应的实验方法及步骤

(1) 在电解池中加入硫蓝浓溶液和经蒸汽灭菌的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液, 使硫蓝浓度为 $1500 \mu\text{mol/L}$, 并加入葡萄糖 2g/L , 通 N_2 1h 以除去溶液中的溶解氧 (实验过程中一直通 N_2 以维持厌氧气氛)。

1. 仪器: M750UVIS-A型微量紫外可见分光光度计。

2. 将仪器置于 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温箱中, 恒温半小时后开始测量。

3. 将硫堇和磷酸盐缓冲液的混合液(含硫堇 $100\mu\text{mol/L}$ 、葡萄糖 2g/L) 除氧 1h, 用吸管吸取 3ml 左右置于 $1 \times 1\text{cm}$ 的比色皿中, 同时加入一定量的菌悬液, 并立即在液面上滴加 6—7 滴的液体石蜡以隔绝空气, 以不加硫堇但加有相同量的菌悬液和葡萄糖的磷酸盐缓冲液作为对比, 在 598nm 的波长^[10]下测定吸光度随时间的变化。

菌悬液的制备及计数见后文。

(四) 微生物电极的工作原理

图 1 所示的微生物电极在正常工作情况下, 阴极将发生的还原反应是 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + e \rightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 。而对于阳极过程, 可分为下列步骤: (1) 微生物将硫堇从氧化态还原成还原态; (2) 还原态的硫堇从溶液扩散到阳极表面; (3) 还原态的硫堇在阳极上发生双电子氧化反应^[10]; (4) 氧化态的硫堇从电极表面向溶液扩散。

微生物电极的工作原理如图 3 所示。

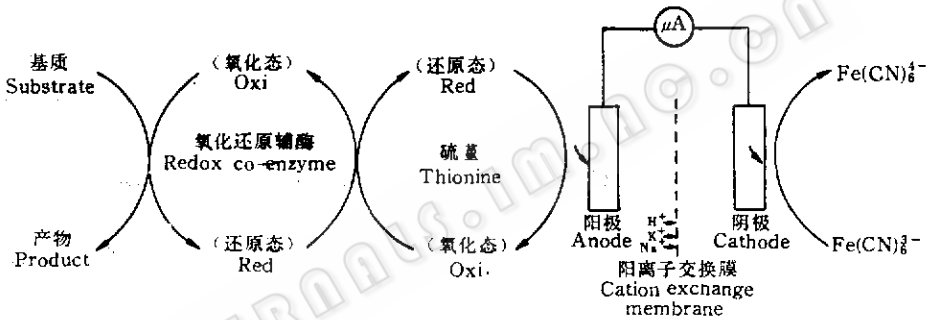


图 3 微生物电极的工作原理示意图
Fig. 3 Scheme of operation principle of microbial electrode

左边表示微生物电极的阳极过程, 右边表示微生物电极的阴极反应。阳极上的电子通过外测量线路流到阴极, 同时阳离子穿过阳离子交换膜从阳极区迁到阴极区。通过测量微生物电极的电流上升速率, 可知阳极液中所含微生物的浓度(图中阳、阴极所示箭头上为“e”)。

结果与讨论

(一) 阴极反应研究

利用三电极系统对阴极反应进行恒电流极化研究, 结果如图 4 所示。对于 $0.01\text{mol/L K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 - 0.01\text{mol/L K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液, 稳定电极电位为 162mV

(SCE) 左右。由于溶解氧的影响, 在较小的极化电流下, 不通 N_2 除氧时的电位极化程度比通 N_2 除氧时要大一些。但极化电流较大时, 通 N_2 与不通 N_2 两种情况的极化曲线已完全平行, 说明此时溶解氧的影响已经很小。对于 $0.1\text{mol/L K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 - 0.1\text{mol/L K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液, 稳定电极电位为 194mV (SCE) 左右, 除了在较小极化电流下有微小的差别外, 通 N_2 与不通 N_2 两种情况的极化曲线几乎重合, 且电位极化程度比 $0.01\text{mol/L K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 - 0.01\text{mol/L K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 小得多。对于饱和的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 - \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液, 稳定电极电位为 295mV (SCE) 左右, 此时不论通 N_2 还是不通

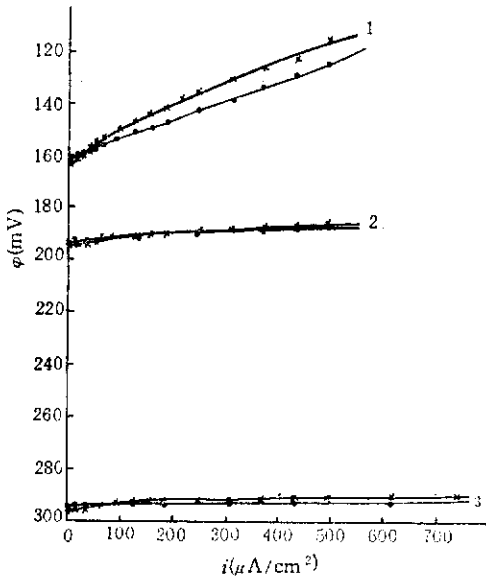


图 4 $K_3Fe(CN)_6-K_4Fe(CN)_6$ 溶液的恒电流阴极极化曲线

Fig. 4 Galvanostatic cathodic polarization curves in $K_3Fe(CN)_6-K_4Fe(CN)_6$ solutions (37°C)

- 1. 0.01mol/L $K_3Fe(CN)_6$ -0.01mol/L $K_4Fe(CN)_6$
- 2. 0.1mol/L $K_3Fe(CN)_6$ -0.1mol/L $K_4Fe(CN)_6$
- 3. Saturated $K_3Fe(CN)_6-K_4Fe(CN)_6$
 - 通 N_2 , Purged with N_2
 - × 不通 N_2 , Not purged with N_2

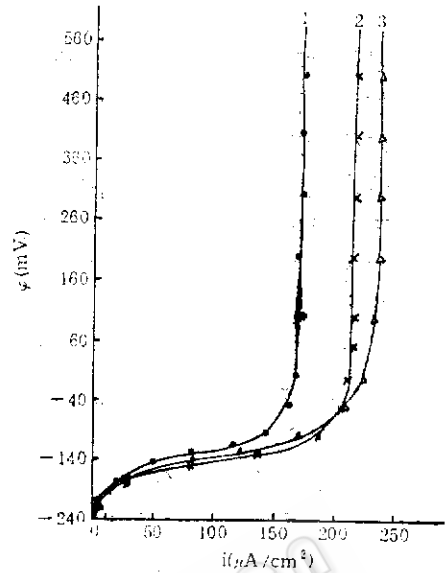


图 5 利用旋转圆盘电极装置所测得的阳极极化曲线

Fig.5 Anodic polarization curves determined by using rotating disk electrode apparatus 37°C, 硫堇 Thionine 1500μmol/L, *E. coli* 8.5×10^8 cells/ml, 葡萄糖 Glucose 2g/L

- 1. 2000rpm 2. 3000rpm 3. 4000rpm

N_2 , 不论极化电流较大还是较小, 电位极化已经很小。所以, 选择饱和的 $K_3Fe(CN)_6-K_4Fe(CN)_6$ 为阴极液, 不但可以获得较正的阴极电位, 以保证阳极反应处于扩散控制区, 而且阴极电位非常稳定, 在几十微安的极化电流(微生物电极正常工作时的电流输出为几十微安)下基本上不发生变化。

(二) 阳极反应研究

图 5 是利用图 2 所示的旋转电极测量装置所测得的 2000、3000 和 4000rpm 三个不同转速时的恒电位阳极极化曲线。可以看出: 硫堇完全还原后的阳极电位为 -240mV(SCE)左右; 在阳极极化电位达到 100mV(SCE) 时, 阳极反应已基本上完全由扩散所控制。

图 6 是在 300mV (SCE) 阳极极化电位下电流密度*i*与旋转电极的转速(*r/s*)平方根 $\sqrt{\omega}$ 之间的关系曲线。可以看出, 在 $\sqrt{\omega}$ 为 8.16(即 4000rpm)以下, *i*与 $\sqrt{\omega}$ 成直线关系, 阳极反应受扩散控制; 在 4000 rpm 以上时, 数据开始偏离直线, 转速越

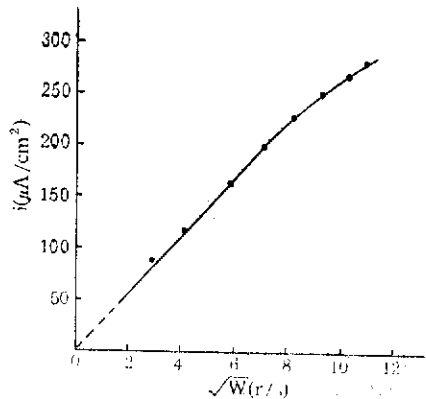


图 6 电流密度与 $\sqrt{\omega}$ 的关系曲线
Fig.6 Relation between current density and $\sqrt{\omega}$ 37°C, 硫堇 Thionine 1500μmol/L, *E. coli* 8.5×10^8 cells/ml, 葡萄糖 Glucose 2g/L

高，偏离程度愈大，这说明在较高转速下，由于扩散过程加快，阳极反应已不完全受扩散控制，而是扩散与电化学反应混合控制或电化学反应控制。

微生物电极工作时的电流输出是在短路的情况下测得的。通过实验我们发现，从微生物开始还原染料到染料还原结束，微生物电极短路后的阳极电位从 220mV (SCE) 变化到 170mV (SCE)，可见，阳极反应的电位完全处于扩散区。由于进行微生物浓度测定时所用硫堇的浓度比上述实验所用的浓度低得多（一般200—300 μmol/L），并且所用的磁搅拌转速也较低（500rpm 左右），所以，可以肯定，微生物电极的阳极反应受扩散控制。

(三) 染料还原动力学的研究

图 7 是用分光光度计所测得的酵母菌还原硫堇的吸光度-时间曲线。可以看出，对于曲线 2、3、4，在初始的一段或长或短的时间内，吸光度与时间成线性关

持续时间越长；酵母浓度越大，持续时间越短。由于吸光度的下降与染料浓度无关，这段时间内酵母对染料的还原是零级反应。而在反应的后期，吸光度的对数值与时间成线性关系（图 8），这表明在这段时间内染料的还原按一级反应进行。在零级反应阶段和一级反应阶段之间，是反

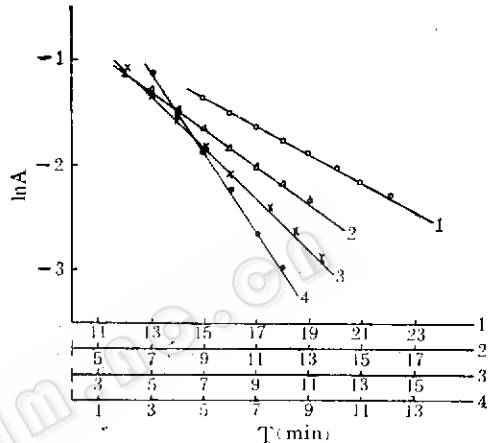


图 8 反应后期吸光度的对数值与时间的关系曲线
Fig.8 Relation between the logarithm of absorbance and time in the late stage

- 1. 2.75×10^7 cells/ml
- 2. 5.5×10^7 cells/ml
- 3. 8.3×10^7 cells/ml
- 4. 11.0×10^7 cells/ml

应级数介于 0 和 1 之间的混合级反应阶段。

对于曲线 1，在最初的几分钟内，吸光度下降较慢，这是由于测试液中微量溶解氧影响的结果。一旦溶解氧被完全消耗（或溶解氧的影响很小），染料的还原就以与曲线 2、3、4 相同的律规进行（酵母菌的耗氧能力较强，在浓度较高的情况下，微量溶解氧几乎不产生影响）。

可以将微生物还原染料的反应看作酶促反应。根据图 7、图 8 以及 Roller 等人^[10]的实验结果，在厌氧条件下微生物还原染料的反应是不可逆反应。因此，可以用米氏型方程

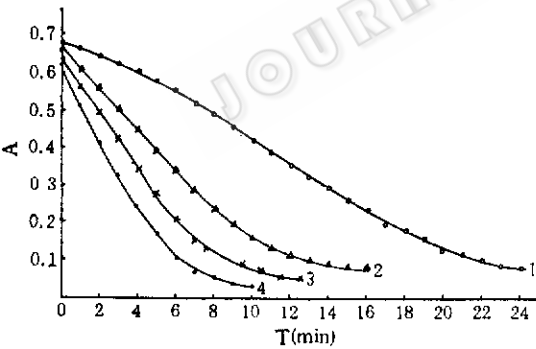


图 7 酵母菌还原硫堇的吸光度-时间曲线
Fig.7 Absorbance-time curves of yeast reducing thionine

- 30℃, 硫堇 Thionine 100μmol/L, 葡萄糖 Glucose 2g/L
- 1. 2.75×10^7 cells/ml
 - 2. 5.5×10^7 cells/ml
 - 3. 8.3×10^7 cells/ml
 - 4. 11.0×10^7 cells/ml

系，此后随着染料的被还原，吸光度下降逐渐缓慢。吸光度线性下降持续时间的长短，与酵母的浓度有关；酵母浓度越小，

$$-\frac{dC_{oxi}}{dt} = \frac{V_{max} C_{oxi}}{k_i + C_{oxi}}$$

来解释染料的还原动力学^[11,12]。在反应的初期, 染料的浓度较大, 同时酵母菌还原染料的能力又较弱, 微生物中的氧化还原辅酶为染料所饱和, 米氏型方程即变为零级反应方

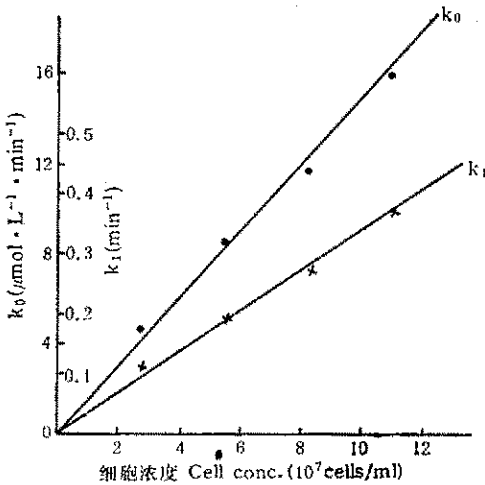


图9 零级反应速度常数 k_0 和一级反应速度常数 k_1 与酵母菌浓度的关系

Fig.9 Relations between yeast concentration and both zero-order reaction rate constant k_0 and first-order reaction rate constant k_1 .

程。而在反应的后期, 染料浓度较小, 米氏型方程即变为一级反应方程。

图9是根据图7和图8所得到的零级反应速度常数 k_0 和一级反应速度常数 k_1 与酵母菌浓度之间的关系曲线。可以看出, k_0 和 k_1 都与酵母菌浓度成线性关系。根据上述讨论, $k_0 = V_{max}$; $k_1 = \frac{V_{max}}{k_i}$, V_{max} 为

最大反应速率, k_i 为半饱和常数。因为 $V_{max} = k \cdot X$ (X 为微生物的浓度), 所以 k_0 和 k_1 必然与微生物的浓度成线性关系。

对其他种类微生物对染料的还原动力学的研究还表明, 如果微生物的耗氧能力较弱, 则在微生物浓度不太高时, 染料的还原存在明显的“延迟期”, 在这段时间内染料几乎不被还原(如枯草杆菌)或还原速率很小(如变形杆菌); 如果微生物对染料的还原能力较强, 则在微生物浓度不太低时, “延迟期”过后染料的还原立即进入混合级阶段或一级反应阶段(如枯草杆菌和变形杆菌)。

参 考 文 献

- [1] Wilkins, J.R. et al., *Appl. Microbiol.*, 27:949, 1974.
- [2] Wilkins, J. R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:214, 1978.
- [3] Wilkins, J. R. et al., *J. Am. Water Works Assoc.*, 68:257, 1976.
- [4] Junter, G. A. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:307, 1980.
- [5] Charriere, G. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:160, 1984
- [6] Matsunaga, T. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:117, 1979.
- [7] Turner, A. P. F. and Ramsay, G., *Biochem. Soc. Trans.*, 11:445, 1983.
- [8] Matsunaga, T. et al., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10:125, 1980.
- [9] Nishikawa, S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:814, 1982.
- [10] Roller, S. D. et al., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34B:3, 1984.
- [11] 合葉修一等著, 胡章助等译: 生物化学工程——反应动力学, 化学工业出版社, 北京, p. 158, 1984.
- [12] I. H. 西格尔著, 吴经才等译: 生物化学计算, 科学出版社, 北京, p. 160, 1984.

DEVELOPMENT OF MICROBIAL ELECTRODE AND STUDIES ON ITS CATHODIC AND ANODIC REACTIONS

Yang Maoyu Yang Zhang

(Department of Applied Chemistry, Nanjing Institute of Chemical Technology, Nanjing)

In this paper, the construction and the basic principle of a fuel cell-type microbial electrode used for the rapid determination of microbial concentration were described. Cathodic and anodic reactions were investigated by means of the galvanostatic cathodic polarization and rotating disk electrode potentiostatic anodic polarization respectively. The kinetics of dye (thionine) reduction was studied by using spectrophotometry. The results showed that cathodic potential in saturated $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ solution was hardly polarized at the normal current of the electrode; anodic reaction was controlled by diffusion; the kinetics of dye reduction by microorganisms conformed to Michaelis-Menten type of equation; dissolved oxygen, microbial concentration, and microbial ability to reduce dye significantly affected the kinetics of dye reduction.

Key words

Determination of microorganism; microbial electrode; redox mediator; thionine; yeast; bacteria