



Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски”

Химически факултет

Катедра “Органична химия”

ДИПЛОМНА РАБОТА

За придобиване на ОКС „бакалавър“



Тема:

**Изследване на азобагрила като екзогенни медиатори на
екстрацелуларен електронен пренос**

Дипломант: Елеонора Йорданова Хубенова

Специалност: Медицинска химия

Факултетен номер: 2205571015



**Научни ръководители: доц. д-р Мина Тодорова,
доц. д-р Димитър Петров**

Пловдив
22 юли 2025г.

С благодарност към:

Научната разработка е интердисциплинарна и включва изпълнението на задачи по проект „Биоелектрохимични системи за почистване на органични замърсители“ с номер КП-06-Н67/6/2022“. Изследванията са осъществени в специализираните лаборатории „Багрила“- ПУ и „Биоелектрохимия и биоенергетика“ - ПУ, интегрална лаборатория на националната научна инфраструктура „Съхранение на енергия и водородна енергетика“. Изказвам благодарности на Катедра „Микробиология“ към УХТ, гр. Пловдив, за проведените анализи за антибактериална активност на багрилата, и на проф. дхн Васил Делчев и д-р Николай Тошев за безценната помощ в реализацията и анализа на резултатите на квантово химичните изчисления, осъществени чрез Българско Министерство на образуванието и науката, проект No. D01-325/01.12.2023 и на гл. ас. Огнян Димитров – за направените снимки на биоелектродите СЕМ (в ИЕЕС-БАН, по проект № BG16RFPR002-1.014-0009 „Развитие и устойчивост на Център за компетентност ХИТМОБИЛ“, финансиран от Програма „Научни изследвания, иновации и дигитализация за интелигентна трансформация“ 2021-2027 г., -гр. София). Изказвам благодарност на научните си ръководители доц. д-р Мина Тодорова, доц. д-р Димитър Петров, на проф. дбн Йолина Хубенова, на проф. дхн Марио Митов, *in memoriam*, и всички които допринесоха за изготвянето на интердисциплинарната дипломна работа.

1. Съдържание

1. Съдържание	2
2. Списък на използваните съкращения в текста.....	4
3. Увод	6
4. Литературен обзор.....	7
4.1 Електрохимична клетка	7
4.2 Микробна горивна клетка.....	8
4.2.1 Материали и конструкция	10
4.2.2 Термодинамика и електродвижеща сила	13
4.3 Пренос на електрони от бактериите до анода	17
4.3.1 Механизми на електронен пренос	17
4.3.2 Екзогенни медиатори на електронен пренос от живи клетки до анода	19
4.4 Азобагрила	21
4.4.1 Структура	21
4.4.2 Методи за синтез на азобагрила	23
5. Цел и задачи	25
6. Материали и методи	26
6.1 Електрохимичен анализ на азобагрила	26
6.2 Спектрофотометрични методи – UV-Vis.....	29
6.3 Квантово-химични изчисления.....	32
6.4 Микробиологични методи.....	32
6.4.1 Култивиране на референтен щам.....	32
6.4.2 Образуване на биофилм.....	33
6.4.3 Тестове за антимикробна активност.....	34
6.4.4 Сканираща електронна микроскопия	35

6.5 . Биоелектрохимични системи (БЕС).....	36
6.5.1 Образуване на биофилм върху електродна повърхност	36
6.5.2 БЕС при анаеробни условия	36
7. Резултати и дискусия.....	38
7.1 Абсорбция и фотофизични свойства.....	38
7.2 Електрохимична активност на азобагрила	40
7.2.1 β -Нафтол виолет	41
7.2.2 Оранже G.....	42
7.2.3 Понсо S	44
7.2.4 Оранже II.....	45
7.2.5 Метил оранже	47
7.2.6 Конго червено	49
7.3 Окислително-редукционни свойства на изследваните азобагрила	50
7.4 Определяне на HOMO-LUMO енергийни нива от експериментални данни.....	51
7.5 Сравнение на експериментални данни с квантово химични изчисления	54
7.6 Антимикробна активност на азобагрилата	59
7.7 Екзоелектрогенна активност на <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	62
7.7.1 Култивиране при поляризационни и микроаерофилни условия	62
7.7.2 Култивиране при поляризационни и анаеробни условия	64
7.7.3 Ендогенни медиатори на електронен пренос	65
7.8 Азобагрила като екзогенни медиатори в БЕС	66
7.9 Микроскопско наблюдение на <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	68
8. Изводи	70
9. Основни приноси	71
10. Използвана литература.....	72
Приложения.....	77

2. Списък на използваните съкращения в текста

Използвано съкращение	Значение
mg/ml	Милиграм на милилитър
mM	Милимоларен
NaCl	Натриев хлорид
SDS	Натриев додецил сулфат
WE	Работен електрод
CE	Противоелектрод
RE	Референтен електрод
ГЕ	Галваничен елемент
МГК	Микробиална горивна клетка (MFC)
S	супернатанта, надутаечна течност
μl	микролитър
mA	милиампер
мин	минута
Фиг.	фигура
ЕДС	електродвижещата сила
ЕЕП	Екстрацелуларен електронен пренос
ЕкМ	Екзогенни медиатори на електронен пренос
ЕнМ	Ендогенни медиатори на електронен пренос
ЕТВ	Електрон транспортните вериги
β - Naphtol violet (NV)	β-Нафтол виолет
Ponceau S (PS)	Понсо S
Orange G (OG)	Оранже G
Orange II (OII)	Оранже II
Methyl orange (MO)	Метил оранж
Congo red (CR)	Конго червено
Phi	фосфатен буфер
CV	Циклична волтампетрия
DPV	Диференциална импулсна волтампетрия
EIS	Електрохимична импедансна спектроскопия
SEM	Сканираща електронна микроскопия
LBB	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>

НАДН	Никотинамид аденин динуклеотид редуциран
ОСР	Потенциал на отворена верига
OCV	Напрежение при отворена верига
ЕДС	Електродвижешката сила
SHE	Standard hydrogen electrode
HOMO	Най-високата заета молекулна орбитала
LUMO	Най-ниската незаета молекулна орбитала
cfu	Colony forming units (единици формиращи колония)
БЕС	Биоелектрохимични системи
DFT	Density Functional Theory (Теория на функционала на плътността)

3. Увод

В търсене на иновативни методи за добив на екологично чиста възобновяема енергия преди повече от 100 години се ражда идеята за микробиалните горивни клетки (МГК). Микробиалните горивни клетки предоставят възможност за добив на електрическа енергия от органични отпадъци и биомаса. МГК имат няколко предимства пред често използваните технологии за генериране на енергия от органична материя. Най-важните от тях са, че използват субстрати от възобновяеми източници, имат висока ефективност на преобразуване, работят при стайна температура и не замърсяват околната среда. Преди 10 години Европейската комисия официално приема МГК като технология на бъдещето с минимален въглероден отпечатък. МГК са „въглеродно неутрални“ – при окисляването на органичните вещества се освобождава въглерод, който не натоварва допълнително въглеродния баланс.

Досега постигнатите стойности за мощност и плътност на тока при МГК остават ниски, което представлява основно препятствие за по-широкото им използване като енергийни източници. Един от ключовите ограничаващи фактори за ефективността на микробиалната горивна клетка е преносът на електрони от живите клетки към повърхността на анода. Има три основни механизма за това преминаване на електрони: чрез директен трансфер на електрони през мембранни совалки-преносители (обикновено в биофилм); чрез добавени екзогенни посредници; или чрез ендогенни медиатори, произведени от самите бактерии. Откриването на нови субстанции и молекули, които да подпомагат екстрацелуарния електронен пренос в подобни сложни системи е съпроводено от множество изисквания, сред които електрохимична активност, специфичен потенциал, добри окислително-редукционни свойства, липса на антимикробна активност, оптимални рН и температура. Съединенията, които отговарят на всички тези изисквания, трябва да бъдат специфични за различните видове микроби. Сред изследваните и добре познати изкуствени медиатори са Тионин, Метиленово синьо, Неутрално червено, 2,6-дихлорофенолиндофенол, Сафранин-О, Фенотиазин и Бензил виологен.

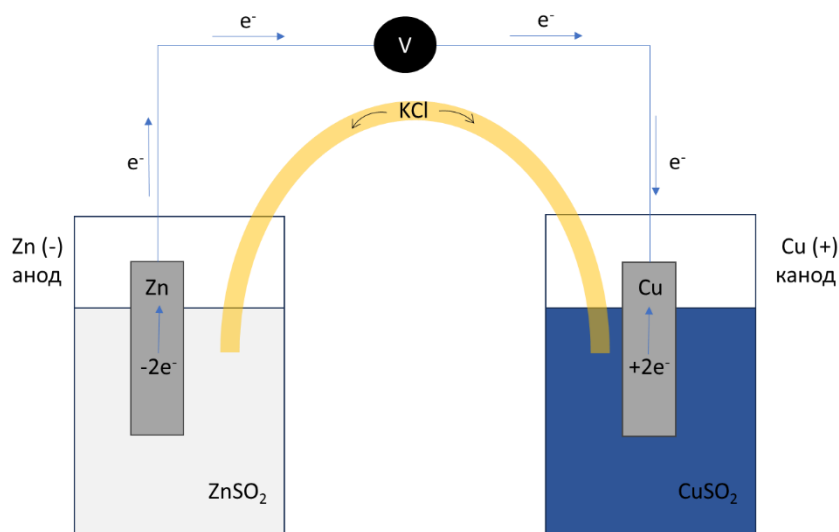
Оптимизирането на електронния пренос от микроорганизмите към анода, което е пряко свързано с увеличаването на генерирания електрически ток и достигнатата мощност, продължава да представлява съществено предизвикателство пред бъдещето

развитие и практическото приложение на микробните горивни клетки (МГК). В тази връзка се интензифицират изследванията, насочени към разработването на нови стратегии за неговото подобряване.

4. Литературен обзор

4.1 Електрохимична клетка

Електрохимичните клетки са устройства, в които протичат процеси на окисление и редукция на фазовата граница между електродите и електролита, под въздействието на потенциална разлика. При Галваничните елементи (ГЕ) тази реакция протича спонтанно, докато електролизната клетка се нуждае от външен източник на енергия. Конструкцията на ГЕ най-често се състои от двукамерна клетка съдържаща анод и катод потопени в еднакъв или различен електролит, които са свързани със солеви мост (Фиг.1). Електродът, върху чиято повърхност се извършва окислителен процес, се нарича анод, а този, върху който протича редукционен процес се нарича катод. При окислително-редукционните реакции в ГЕ се пренасят електрони до анода и химичната енергия се преобразува в електрична без намесата на външен източник на енергия [1].



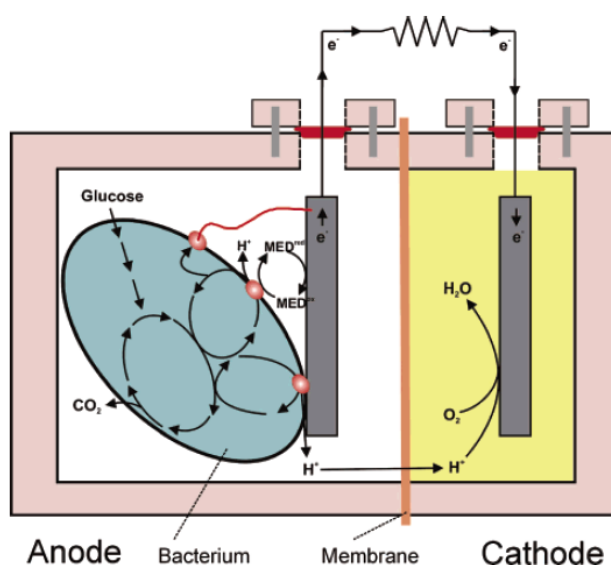
Фиг.1. Модел на електрохимична клетка с цинков анод и меден катод (Галваничен елемент на Даниел-Якоби).

За да се предвиди посоката и степента на протичане на окислително-редукционни реакции, е необходимо да се оцени силата на окислителите и редукторите чрез величината електроден потенциал на съответната редокс двойка. По-висок електроден потенциал показва по-силен окислител, докато по-нисък потенциал съответства на по-силен редуктор. Стойността на потенциала на една отделна полуреакция (окисление или редукция) не може да бъде измерена директно. Възможно е единствено измерване на потенциалната разлика между два електрода, свързани в електрохимична клетка. Поради това се налага въвеждането на стандартен електрод за сравнение – стандартният водороден електрод, чийто електроден потенциал по дефиниция е приет за 0 V. Така при измерване на електродвижещата сила (ЕДС) на галванична клетка, съставена от изследван електрод и стандартния електрод, се определя относителната сила на дадената редокс двойка. Това позволява изграждането на електрохимични редове и предсказване на спонтанността на редокс процесите. Често прилаган референтен електрод (RE), електрод с известен и стабилен електроден потенциал, използван за сравнение при измерване на потенциала на друг електрод е сребро-сребърно хлориден електрод (Ag/AgCl). Електрохимичната клетка, използвана в електрохимични измервания, особено при волтамперометрия, потенциостатични и други аналитични методи, е с триелектродна конфигурация. За да затвори електрическата верига и се проведе ток се използва противоелектрод (CE). Токът тече между работния електрод (WE), където се извършва електрохимичната реакция (окисление/редукция) и противоелектрода.

4.2 Микробиална горивна клетка

Микробиалните горивни клетки (МГК) спадат към електрохимичните клетки, но са свързани с окислението на различни органични субстанции в катаболитните пътища на микроорганизми - бактерии или дрожди (Фиг. 2). Микроорганизмите се култивират в анодното пространство при определени условия и субстрат за последвалото окисление. В областта на МГК те се наричат биокатализатори. При добро развитие на биокатализаторите се образува биофилм върху електрода и се постига ефикасен обмен на електрони. Анодното отделение обикновено се поддържа при анаеробни условия, докато катодът може да бъде потопен в аеробни разтвори или изложен на въздух. Електроните преминават от анода към катода през външна електрическа верига, която обикновено включва резистор, батерия за зареждане или друго електрическо

устройство. Анодът и катодът често са разделени от полупропусклива мембрана, която ограничава дифузията на кислород от катодната камера към анодната камера, като същевременно позволява на протоните, които се освобождават в процес на окисляване, да се преместят от анода към катода. На катода електрони, протони и кислород се комбинират, за да образуват вода [2].



Фиг. 2. Схема на Микробиална горивна клетка с протон-обменна мембрана.

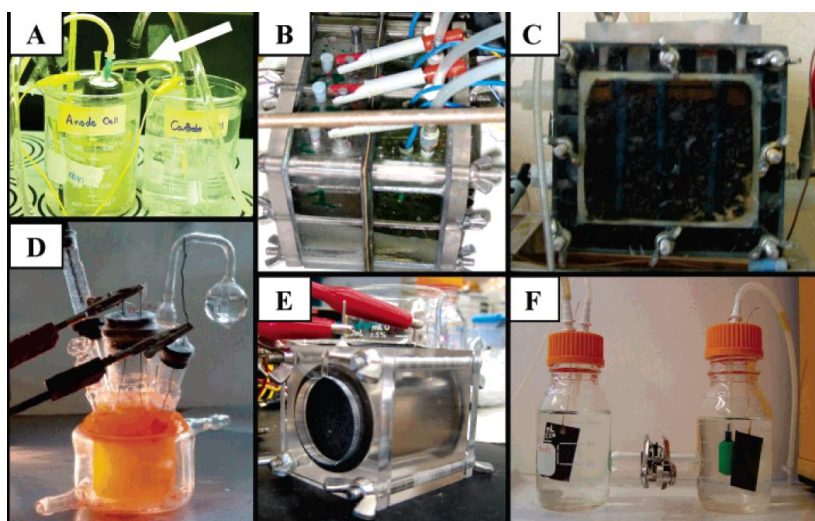
Началото на МГК е поставено още през 1910 от Potter et al. , който установява че разграждането на органични съединения от микроорганизми (катаболизъм) е съпроводено с освобождаване на електрическа енергия [3]. Интересът към МГК е възобновен след публикациите на Benetto et al.[4] след почти 70 години, в които той показва, че електронният пренос от дрожди към анода се медира от изкуствено добавено розово флуоресцентно багрило - резоруфин. 20 години по-късно, през 2006, Bruce Logan описва подробно начина на действие и значимостта им [5] и се превръща в един от основоположниците на съвременните тенденции за тяхното развитие и разработване. В търсене на иновативни технологии за пречистване на отпадни води от началото на 21 век до днес областта на изследване на микробиалните горивни клетки се разширява значително. Изследвани са както електроди от различни материали [6], така и множество бактериални култури при разнообразни условия с цел да се открият най-

оптималните параметри за улесняването на екстрацелуларен електронен пренос (ЕЕП) и подобряване на производителността на МГК [7].

4.2.1 Материали и конструкция

Logan et al. публикуват обстойно ревю на съществуващите видове МГК (MFC), което се превръща във важен ресурс за много учени [5]. Авторите представят основните компоненти и елементи на конвенционалните горивни клетки, включително конструкцията, и видовете системи.

Често използваният и леснодостъпен дизайн на микробиална горивна клетка е двукамерната клетка с традиционна форма "Н" (Фиг.3). Тя обикновено се състои от две бутилки, свързани с тръба, през която преминава сепаратор – обикновено катионно-обменна мембрана като Nafion или Ultrex, или обикновен солеви мост (Фиг.3a,f).



Фиг. 3. Видове МГК използвани в проучванията: (А) лесно конструирана система, съдържаща солеви мост (показан със стрелка); (В) четири МГК от партиден тип, където камерите са разделени от мембраната; (С) същото като В, но с непрекъснат поточен анод (гранулирана графитна матрица); (D) фотохетеротрофен тип МГК; (Е) еднокамерна система с въздушен катод; (F) двукамерна система от Н-тип, оборудвана за разпръскване на газ. [5]

Основният принцип на този дизайн е изборът на мембрана, която позволява на протоните да преминават между камерите, но ефективно да блокира преминаването на субстрата или акцептора на електрони (като кислорода в катодната камера). Н-образните системи представляват подходяща експериментална платформа за изследване на фундаментални параметри, като например енергийната ефективност при използване на нови електродни материали или характеризирането на микробни консорциуми, формиращи се по време на разграждането на специфични органични съединения. Въпреки това, подобни конфигурации обикновено се характеризират с ниска плътност на мощността. Количеството генерирана енергия в тези системи е обусловено от съотношението между повърхностната площ на катода и тази на анода, както и от общата повърхност на използваната йоннообменна мембрана [5].

Анодните материали, използвани в микробните горивни клетки (МГК), трябва да бъдат електропроводими, биосъвместими и химически стабилни. Докато мрежата от неръждаема стомана е приемлив метален анод поради своята устойчивост на корозия, медта е неподходяща, тъй като дори следи от медни йони са токсични за бактериите. Въглеродът се счита за най-универсалния аноден материал, наличен в различни форми, включително графитни плочи, пръти, гранули, въглероден филц, плат, хартия, влакна, пяна и стъклен въглерод [5]. Използваното разнообразие от анодни материали в МГК е показано на (Фиг. 4) [6].



Фиг. 4. Широк набор от често използвани конвенционални материали прилагани като аноди в микробиални горивни клетки [6]

За да се подобри ефективността на анода, са изследвани както химически, така и физични модификации. Например Park et al. включва манган (IV) и желязо (III), заедно с ковалентно свързано неутрално червено, за да улесни трансфера на електрони [8]. Модифицирането на въглероден плат с NiFeP [9] води до 4 пъти по-високи електрически характеристики, а с електрохимично отложен Ni е достигната мощност 20 пъти по-голяма от тази с немодифициран въглероден плат [10] достигаща до 720 mW/m². Паралелно проведени експерименти в присъствието на екзогенен медиатор Метиленово синьо показват 10 пъти по-добри електрически характеристики при това с намаляване на себестойността на използвания немодифициран анод [10].

Съвременните анодни материали са допълнително подкласифицирани в две категории, които са показали значението си при генерирането на енергия, както и при пречистването на отпадъчни води. Подкатегориите на съвременните анодни материали са базирани на въглероден аноден материал от естествена биомаса и композитен материал, който включва метал/метални оксиди, материали на основата на въглерод и проводими полимери [6].

Калиевият хексациано ферат ($K_3 [Fe(CN)_6]$) често се използва като електронен акцептор (католит) в микробниални горивни клетки поради своята висока ефективност. Основното му предимство е ниският свръхпотенциал, който позволява прилагането на обикновени въглеродни катоди с работен потенциал, близък до напрежението при отворена верига. Сред основните недостатъци се открояват необходимостта от честа подмяна на католитния разтвор поради ограничената възможност за реоксигенация от въздуха, както и потенциалната дифузия на калиевия хексациано ферат през катионообменната мембрана към анодната камера, което може да компрометира дългосрочната стабилност на системата.

Кислородът представлява най-подходящият електронен акцептор за МГК поради своя висок редокс потенциал, широка достъпност, ниска цена (тъй като е свободно наличен), устойчивост и екологична безопасност – единственият му краен продукт е водата. Изборът на материал за катода оказва съществено влияние върху ефективността на системата и се определя от конкретното приложение [5]. Най-често се използват газ-дифузионни електроди.

4.2.2 Термодинамика и електродвижеща сила

За да бъде възможно протичането на електрогенериращ процес в галваничен елемент, е необходимо съвкупният редокс процес, осъществяван на двата електрода, да бъде термодинамично изгоден. Критерий за тази изгодност е отрицателната стойност на промяната в свободната енергия на Гибс ($\Delta G_r < 0$), което е необходимо условие за спонтанност на процеса.

Промяната в свободната енергия на Гибс при произволни (нестандартни) условия се определя от следното уравнение:

$$\Delta G_r = \Delta G_r^0 + RT \ln(\Pi)$$

където:

- ΔG_r е свободната енергия на Гибс в J при текущите условия;
- ΔG_r^0 е стандартната свободна енергия на Гибс в J, отнасяща се към стандартни условия (1 бар, 298.15 K, концентрация на разтворите $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);
- $R = 8.31447 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ е универсалната газова константа;
- T е абсолютната температура в K;
- Π е реакционният коефициент, изразен като отношението на произведението от активностите на продуктите към произведението от активностите на реагиращите вещества, повдигнати на степен, равна на техните стехиометрични коефициенти.

Връзката между термодинамичната характеристика на процеса (ΔG_r) и електрохимичната работа (W), извършвана от галваничния елемент, се изразява чрез електродвижещото напрежение ($E_{\text{emf}} Q$):

$$W = E_{\text{emf}} Q = - \Delta G_r$$

където:

- W е извършената електрохимична работа ;
- $Q = nF$ е обменения заряд в кулони (C), като n е броя електрони за мол и F е константата на Фарадей ($9.64853 \cdot 10^4 \text{ C/mol}$).

- Така електродвижещото напрежение може да се представи като:

$$E_{emf} = -\frac{\Delta G_r}{nF}$$

При стандартни условия: $E_{emf}^0 = \frac{\Delta G_r^0}{nF}$

E_{emf}^0 изразено във волтове е стандартното електродвижещо напрежение на ГЕ.

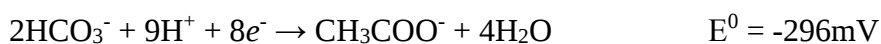
Електродвижещото напрежение на всеки един ГЕ може да бъде представено като:

$$E_{emf} = E_{emf}^0 - \frac{RT}{nF} \ln(\Pi)$$

Електродвижещото напрежение на един ГЕ е равно на:

$$E_{emf} = E_{cat} - E_{an}$$

За случая на окисление на ацетат на анода и редукция на кислород на катода, например, стандартните електродни потенциали са равни на:



За дадените условия потенциалът на анода (E_{an}) ще бъде равен на:

$$E_{an} = E_{an}^0 - \frac{RT}{8F} \ln\left(\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{HCO}_3^-]^2[\text{H}^+]^9}\right)$$

Окислението на глюкозата е изключително термодинамично изгоден процес ($\Delta G^0 \ll 0$), което я прави потенциален източник на електрическа енергия. Тъй като окислението на глюкозата до CO_2 е многоетапен процес, включващ ензимно катализирани реакции в живи бактериални или дрождени клетки в сложни биоелектрохимични системи (в МГК), то няма единен стандартен редокс потенциал, а по-скоро потенциалът на различните междинни стъпки може да се пресметне като той се равнява на $-0,05\text{ V}$ до $-0,1\text{ V}$ (vs. SHE).

При преноса на електрони от субстрат с нисък потенциал към електронен акцептор с по-висок потенциал бактериите в МГК получават необходимата енергия (под формата

на АТФ). Тя може да бъде изчислена като изменението на свободната енергия на Гибс (ΔG) в системата :

$$\Delta G = -nF\Delta E$$

където n е броя обменени електрони, F – константата на Фарадей, а ΔE е разликата между потенциалите на донора и акцептора на електрони.

Работата на МГК може да се разглежда като продукт на едновременно протичащите полуреакции на катода и анода. Напрежението, което един МГК генерира е функция на индивидуалните потенциали на двата електрода.

Потенциалът на катода (E_{cat}) се изразява като:

$$E_{cat} = E_{cat}^0 - \frac{RT}{4F} \ln\left(\frac{1}{pO_2[H^+]^4}\right)$$

В примера на окисление на ацетат върху анода и редукция на кислород върху катода при стандартни условия се получава потенциална разлика между двата електрода от $\approx 1.2V$. Това е теоретично максимално постижимото електродвижещо напрежение на МГК при условие, че отсъстват ограничаващи процеси. Ако катодът и анодът на един МГК не са свързани със електрически проводник, се измерва напрежение на отворена верига (OCV). OCV е напрежението, което генерира един МГК ако през веригата не протича електричен ток. Теоретично напрежението на отворена верига трябва да бъде близко или еднакво с електродвижещото напрежение, но поради редица лимитиращи фактори, практически е значително по-ниско.

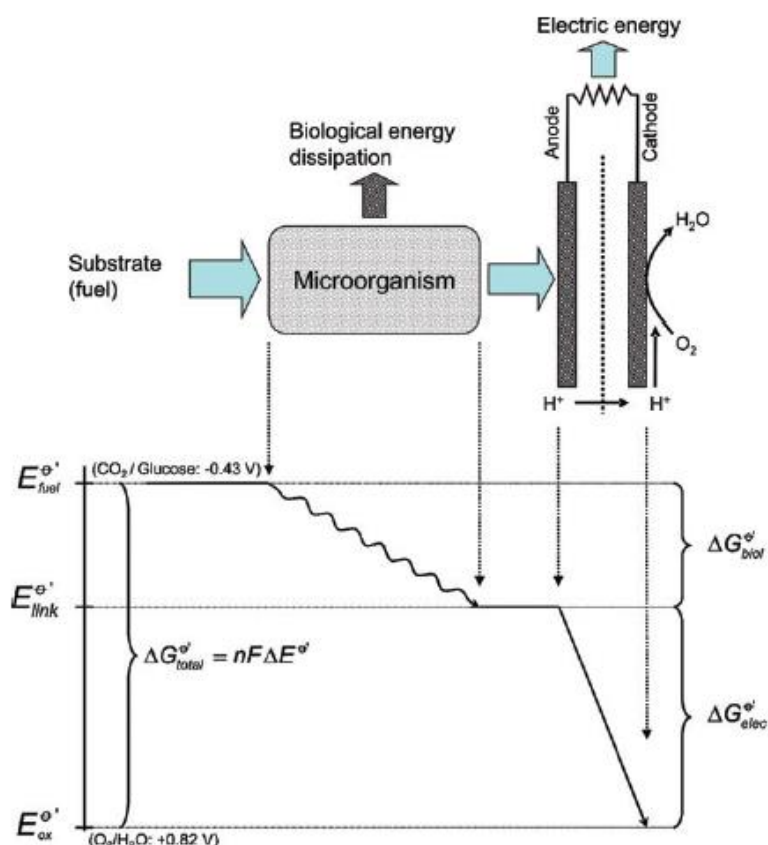
В електрохимичните системи, включително ензимните биогоривни клетки, използващи органични субстрати като глюкоза, често се прилагат екзогенни медиатори с цел улесняване на електронния трансфер между редуциращия агент (напр. ензим или молекула глюкоза) и електрода. Тези медиатори действат като преносители на електрони, участвайки в обратими редокс процеси с добре дефинирани потенциали.

Въпреки че стандартният електроден потенциал E_{cell} е термодинамично определен и не се изменя от наличието на медиатори, практическото електродвижещо напрежение на клетката често се увеличава. Това се дължи на значително намаляване на кинетичните загуби, свързани с преноса на електрони (т.е. понижаване на анодното пренапрежение).

В отсъствието на медиатори директният електронен трансфер от органичните молекули към електрода протича затруднено поради липсата на електронна комуникация, особено когато се използват ензимни системи със слаба електропроводимост.

Следователно, въпреки че екзогенните медиатори не променят термодинамичната стойност на електродния потенциал, тяхното присъствие води до подобряване на електрохимичната ефективност на системата чрез осигуряване на по-бърз и енергийно по-изгоден електронен трансфер. Това има пряко отражение върху реално измерваното напрежение на клетката и нейната мощност.

Микроорганизмите могат да улеснят преобразуването на химическата енергия на субстрата в електричество, но запазват дадена част от свободната енергия на Гибс, за собственото си оцеляване и размножаване (Фиг. 5).



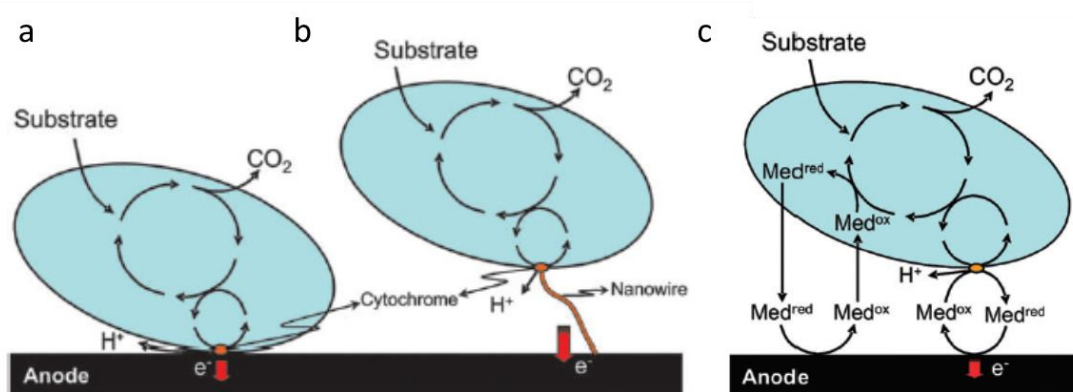
Фиг. 5. Схематично представяне на енергийния поток в микробиална горивна клетка от Uwe Schröder [11] .

4.3 Пренос на електрони от бактериите до анода

4.3.1 Механизми на електронен пренос

За всеки микроорганизъм, приложен като биокатализатор, изясняването на механизмите, чрез които вътреклетъчните електрони, получени от окислението на електрон-донорите (субстрати), се транспортират до анода на МГК, е от съществено значение. Механизмите за ЕЕП са добре установени за бактериални видове, принадлежащи към родовете *Geobacter* и *Shewanella* [12]. Естествените местообитания на тези бактерии са почви и водни седименти, където при липса на кислород те осъществяват метаболизма си с редукция на наличните външни за клетките електронни акцептори, като например Fe(III) или Mn(IV) оксиди. Микроорганизмите, които могат да пренасят електроните си до външен за клетките електронен акцептор (екстрацелуларно), се класифицират като екзоелектрогени. Инокулирани в МГК, екзоелектрогенните бактерии използват по подобен начин анода като извънклетъчен краен електронен акцептор за оптимизиране на енергийния си добив, ето защо те често се наричат анод-дишащи бактерии [13,14].

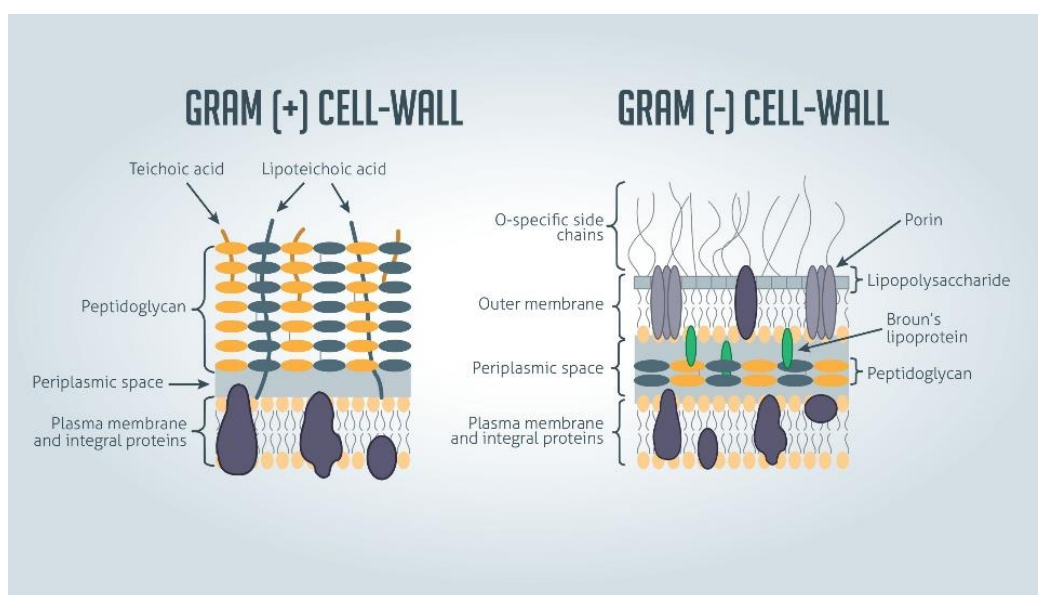
Механизмите на електронен пренос (ЕЕП), установени за бактериите, са класифицирани в два вида: директен ЕЕП — с участието на външно-мембранно асоциирани цитохроми, и/или електропроводими нанонишки (пили), и индиректен ЕЕП или медиран — осъществяван чрез ендогенни (собствено продуцирани) или екзогенни (изкуствено добавени) медиатори на електронен пренос, наричани още електронни совалки (Фиг. 6).



Фиг. 6. Схеми на механизми на ЕЕП: а) Директен ЕЕП чрез мембранно свързани цитохроми; (b) чрез електронно проводими нанопроводници; с) Медиран ЕЕП, представени от Uwe Schröder [11].

Известно е, че *Shewanella putrefaciens*, *Geobacteraceae sulfurreducens*, *Geobacter metallireducens* и *Rhodospirillum rubrum* са способни да образуват електрохимично активни биофилми върху повърхността на анода, които улесняват директния ЕЕП [15].

Бактериите са предимно едноклетъчни организми, които могат да бъдат намерени в голямо разнообразие в околната среда. В зависимост от оцветяването по Грам, те се делят на Грам - положителни и Грам – отрицателни. За разлика от Грам-отрицателните бактерии, които имат външна и вътрешна мембрана, разделени от периплазмено пространство, Грам-положителните бактерии нямат външна мембрана и са заобиколени от клетъчна стена изградена от дебел пептидогликанов слой, състоящ се от линейни полизахаридни вериги, omрежени с къси пептиди, липо тейхоеви и тейхоеви киселини. Дебелите клетъчни стени на бактериите определят формата на клетката и предотвратяват разрушаването ѝ в резултат на осмотично налягане. Въпреки това, клетъчната стена не е бариера за пропускливост, тази функция се изпълнява от плазмената мембрана и нейните компоненти (Фиг. 7).



Фиг. 7. Разлика в структурата на Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии [16].

Метаболизмът на клетъчната стена е свързан с процеса на образуване на биофилм. Развитието на биофилм е многоетапен процес, чиято специфична характеристика е изграждането на извънклетъчен матрикс, който защитава бактериалното общество в биофилма и осигурява достъп до хранителни вещества до клетките на биофилма.

Въпреки че доказаните екзоелектрогени принадлежат към над 40 рода [17], знанията за механизмите на ЕЕП са получени главно чрез обширни изследвания на Грам-отрицателни бактерии, принадлежащи към родовете *Geobacter* и *Shewanella*, изолирани от сладководни и морски седименти. Представители на Грам-положителни бактерии, принадлежащи към родовете *Bacillus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactococcus*, *Paenibacillus* и др., също са идентифицирани в смесени микробни консорциуми от анодни биофилми, но тяхната електрогенност и принос към генерирането на електричен ток не са достатъчно проучени и това остава отворено предизвикателство [18].

По-задълбочен поглед върху ЕЕП механизма на Грам-положителните бактерии е предложен от Wrighton et al. [19], които доказват, че цитохромите от с-тип на *Thermincola potens* играят роля в преноса на заряд през обвивката на бактериалната клетка към извънклетъчен акцептор на електрони. Light et al. [20]. От друга страна, установяват базиран на фламини ЕЕП механизъм за Грам-положителна чревна бактерия *Listeria monocytogenes*. Авторите [20] идентифицират осем-генен локус, който е отговорен за ЕЕП в Грам-положителните бактерии и предполагат, че този локус кодира специализирана NADH дехидрогеназа, която отделя ЕЕП от аеробното дишане чрез канализиране на електрони към отделен мембранно-локализиран хинонов пул. Поради отличителните характеристики на Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии се смята, че те образуват специфични биофилми върху повърхностите. Наскоро бе доказано че електропроводими пили в биофилмите на *Paenibacillus dendritiformis* MA-72 има принос към преноса на електрони от бактериите до анода [18].

4.3.2 Екзогенни медиатори на електронен пренос от живи клетки до анода

Преносът на електрони от бактериите до анода на МГК може да се осъществи както със собствени протеини или молекули– совалки (ендогенни), така и чрез изкуствено добавени такива, наречени екзогенни медиатори (ЕкМ) на електронен пренос [7].

Добавянето на изкуствени преносители на електрони води до предположението, че багрила с различен редокс потенциал могат да отклоняват електрони от различни реакции на катаболитните пътища. По този начин ефективността на електронния транспорт от микроорганизмите към анода може да бъде модулиран чрез използване на багрило с подходяща редокс активност, и да доведе до увеличени стойности на генерирания от системата ток и по-висока мощност. Така например, Babanova et al. установяват, че мощността, постигната от МГК, се увеличава в присъствието на багрилата Бромокрезолово зелено (BcG) < Неутрално червено (NR) < Метил червено (MR) < Метил оранж (MO) < Метиленово синьо (MB) [21]. Наред с по-високи електрически характеристики, добавянето на ЕкМ допринася и за установяването на механизмите на електронен пренос [7]. Чрез добавянето на инхибитори на комплекси I и III на електрон транспортните вериги (ЕТВ) в дрождите, разположени върху вътрешната митохондриална мембрана, и в същото време култивирането на дрождите като биокатализатори, е установено, че правилната функция на митохондриите е директно свързана с пренасянето на електрони и до анода. Намаляване на електрическия заряд, преминаващ през биоелектрохимичната система, с близо 40%, е установен, когато пренебрежимо ниски концентрации на антимицин А са използвани като инхибитор на комплекс III (цитохром bc₁ комплекс) на ЕТВ. При добавен ротенон - инхибитор на първия ЕТВ комплекс (НАДН: убихинон оксидоредуктаза), е наблюдавано намаление на тока с приблизително 25 %. Сравнението на генерирания електрически ток в присъствието и отсъствието на инхибитори предполага, че всеки ЕТВ комплекс допринася за транспортирането на електрони с различен дял. Анализът е показал, че 5,6 % от електроните достигащи до анода, произхождат от комплекс II (сукцинат дехидрогеназа) на ЕТВ [22]. Намаляването на генерирания електричен ток с 40 % съвпада с дела на аеробното дишане в катаболитните процеси на дрождите, което е определено от количество етанол, произведен по време на култивиране на дрожди в присъствието на кислород в сравнение с този, получен при строги анаеробни условия. При добавяне на багрилото Метиленово синьо към дрожди заедно с ротенон е установено, че багрилото участва в преодоляването на митохондриалното отравяне на дрождите, причинено от ротенона и може да служи като алтернативна вътреклетъчна електронна совалка за заобикаляне на блокирането на комплекс I и увеличаване на генерирания ток [22].

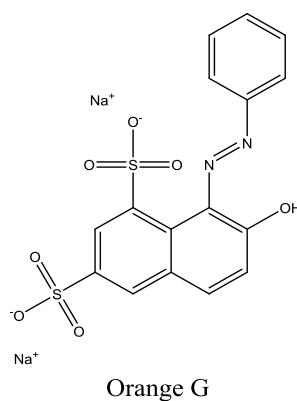
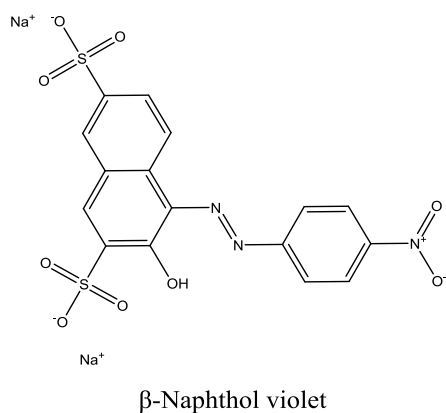
До сега като екзогенни медиатори от азобагрилата са изследвани обстойно само две багрила Метил червено и Метил оранж [21].

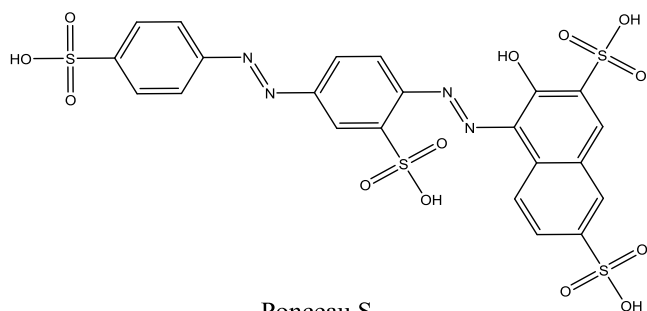
4.4 Азобагрила

4.4.1 Структура

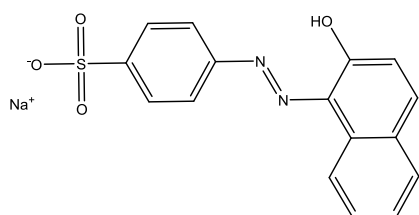
Азобагрилата представляват клас органични съединения, характеризиращи се с наличието на азо група ($-N=N-$), която свързва ароматни пръстени – както карбоциклични, така и хетероциклични структури (Таблица 1) [23,24]. Въз основа на броя на азо връзките в молекулата, тези съединения се класифицират като моноазо, диазо, триазо, полиазо [25]. Азобензенът, съставен от два фенилови пръстена, свързани с двойна връзка, е най-простото съединение в класа на азо съединенията. Подобно на други багрила, азобагрилата имат структурата „донор– π –акцептор“, която допринася за делокализацията на π -електроните [26]. Делокализираната електронна система обхваща бензеновите пръстени и азотните атоми в азо връзката, като това играе ключова роля за техните оптични свойства. Способността за хиперполяризираност произтича от комбинация от силни електронодонорни групи като $-NR_2$, $-OR$ и силни електрон-акцепторни групи като $-NO_2$, $-CN$, $-CF_3$, $-COOH$ и $-SO_3H$, разположени в противоположните краища на конюгирана молекула. Често органичните багрила се функционализират като сулфонатни соли, за да се подобри тяхната разтворимост във вода.

Таблица 1. Структурни формули на използваните азобагрила.

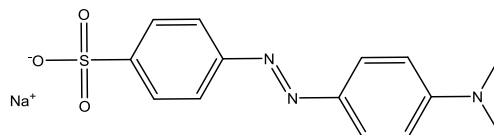




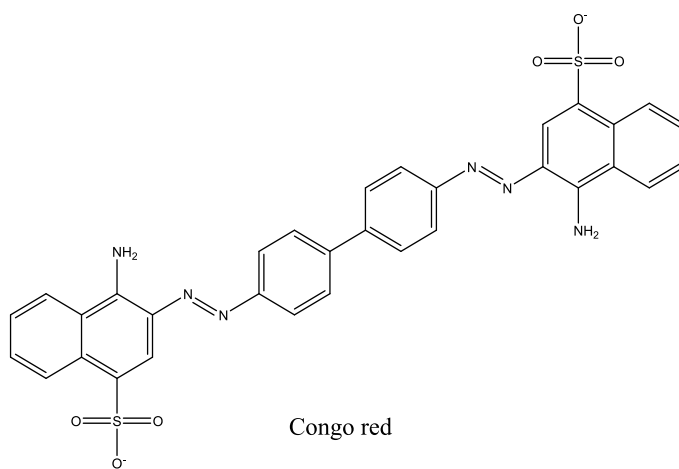
Ponceau S



Orange II



Methyl orange



Congo red

4.4.2 Методи за синтез на азобагрила

Азобагрилата се получават в промишлен мащаб чрез две последователни реакции: диазотиране и купелуване (Таблица 2)[27].

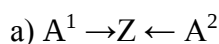
Таблица 2. Изходни вещества и условия за синтез на избрани азобагрила.

№	Багрило	Диазокомпоненти (амини, които се подлагат на диазотиране)	Азокомпоненти
1	β-Нафтол виолет	<i>p</i> -нитроанилин	натриев 3-хидроксинафтален-2,7- дисулфонат
2	Оранжев G	анилин	натриев 7- хидроксинафтален -1,3- дисулфонат
3	Понсо S	<i>p</i> -аминобензенсулфонова киселина (сулфанилова киселина)	натриев 2-аминобензенсулфонат
4	Оранжев II	<i>p</i> -аминобензенсулфонова киселина (сулфанилова киселина)	β-нафтол
5	Метил оранжев	<i>p</i> -аминобензенсулфонова киселина (сулфанилова киселина)	N,N-диметиланилин
6	Конго червено	бензидин	sodium 4-aminonaphthalene-1- sulfonate

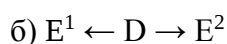
Азобагрилата са най-важният клас търговски багрила. Те представляват около 60-70% на багрилата, използвани в текстилната промишленост. По отношение на техните багрилни свойства азобагрилата са в състояние да осигурят пълната гама от цветове (жълт, оранжев, червен и син цвят) и нюанси. Азобагрилата се отличават с висока интензивност на цвета и изключителна устойчивост към фотостареене, термични въздействия, влага и органични разтворители, което ги класифицира като най-рентабилни от всички химични класове на органични багрила.

Синтезът се усложнява в случаите, когато е необходимо да се проведат две процедури на диазотиране с последващо купелуване [28]. Възможни са четири стратегии, които се обозначават по определен начин съгласно общоприетата терминология и символика – а) – г). Където:

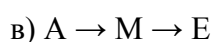
- A_1 и A_2 са ароматни амини (първични ароматни амини), от които се получават диазониеви соли чрез диазотиране;
- Z е куплов партньор (напр. β -нафтол, нафтолсулфонова киселина и др.) – електронно богата ароматична система, способна да куплира с диазониеви соли;
- X е диазо група ($-N=N-$), която е основният хромофор в азобагрилата;
- $Z-X-Z$ е ядро на багрилото – състои се от две ароматични системи, свързани чрез една или две диазо групи.



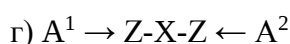
При тази първа стратегия два първични ароматни амини (A и A) се диазотират и взаимодействат поотделно при подходящо рН и в точно определена последователност със свързващ компонент, който има две достъпни места за заместване в ароматното ядро. Стратегията се използва за синтез на багрилото Понсо S.



При тази стратегия първичен ароматен диамин (D) се диазотизира два пъти (*tetrazotised*) и след това се осъществяват две последователни реакции на купелуване с азо компонентите E^1 и E^2 .



При тази трета стратегия първичният ароматен амин има потенциал да се използва едновременно като свързващ компонент и като диазокомпонент.



Описва синтеза на симетрични или асиметрични диазо багрила, при който две различни ароматни амини (A_1 и A_2) се диазотират поотделно и след това взаимодействат с един и същ куплов партньор (Z), който има две активни позиции за купелуване. Пример за багрило получено чрез тази стратегия е Конго червено.

5. Цел и задачи

Целта на настоящата дипломна работа е да се изследват окислително-редукционните свойства, антимикробната активност и поведението на азобагрилата β -Нафтол виолет, Понсо S, Оранж G, Оранж II, Метил оранж, Конго червено за потенциалното им приложение като екзогенни медиатори на електронен пренос в микробиална горивна клетка.

За постигане на тази цел са поставени следните **задачи**:

1. Определяне на НОМО-LUMO енергийни нива и формалния потенциал на азобагрила разтворими в неутрална среда.
2. Изследване на антимикробна активност на азобагрила по отношение на Грам-положителни, Грам-отрицателни бактерии и дрожди.
3. Образуване на електрохимично активен биофилм върху електродна повърхност.
4. Проследяване на възможностите за генериране на електричен ток от биоелектрохимична система в присъствие на азобагрила.

6. Материали и методи

6.1 Електрохимичен анализ на азобагрила

Шест азобагрила - β -Нафтол виолет (NV), Понсо S (PS), Оранже G (OG), Оранже II (OII), Метил оранже (MO) и Конго червено (CR) бяха разтворени в 67 mM фосфатен буфер (Phi, pH 7.1-7.4). Фосфатният буфер се състоеше от 0.084 M Na_2HPO_4 и 0.052 M K_2HPO_4 , смесени в пропорции 61.2:38.8 за оптимален буферен капацитет, като по този начин се предотвратява прекомерно висока йонна сила, която може да повлияе на някои реакции. Електрохимичните анализи бяха проведени в концентрация от 1 mM багрило при 25°C (1 ml обем).

Електрохимичното изследване на всяко багрило започна с измерване на потенциала на отворена верига (OCP) в триелектродна конфигурация, където Pt-тел (Goodfellow, чистота 99.99%, $A=0.55 \text{ cm}^2$) беше свързана като работен електрод, графитизирана хартия (Freudenberg H23C2, въглерод 99,9%, $S=1.5 \text{ cm}^2$) като противоелектрод и микроелектрод Ag/AgCl (3M KCl) (ItalSense) като референтен електрод. За електрохимичните изследвания бяха използвани потенциостат на PalmSens и софтуерът PSTrace.

Потенциалът на отворена верига (OCP), както подсказва името, е потенциалът, при който не тече ток, защото веригата е отворена. Между два метала в един и същ разтвор OCP е най-високата възможна потенциална разлика, без да се прилага потенциал отвън. Измерването на OCP е неинвазивно, тъй като не тече ток.

След това беше проведена циклична волтаперометрия (CV) в същата конфигурация на електродите в рамките на различни стойности на разгъване на потенциала. Потенциалът беше сканиран със скорост на сканиране 100 mV/s, освен ако не е посочено друго. Формалните потенциали на багрилата бяха оценени като средна стойност на анодните и катодните пикови потенциали, наблюдавани върху CV, и изчислени спрямо SHE (+0.205V).

Цикличната волтаперометрия (CV) е електрохимична техника, използвана за изследване на редокс свойствата на даден химически вид. Включва прилагане на

потенциална вълна към електрохимична клетка и измерване на получените токове. Потенциалът се променя линейно с времето, започвайки от начална стойност (E_{begin}), до краен потенциал, след което се връща към началния потенциал. Токовият отговор се записва като функция на приложеното напрежение. Провеждат се две сканирания, като вторият се взима като резултат.

Изследванията продължиха с диференциална импулсна волтамперометрия (DPV), като се променяше диапазонът на потенциала (от -1,5 до +1,5 V). Всички DPV бяха проведени със стъпков потенциал от 0,01 V, импулс от 0,02 V, време на импулса от 0,3 s и скорост на сканиране от 0,01 V.

Диференциалната импулсна волтамперометрия (DPV) е високочувствителна електрохимична техника. Предпочита се поради способността да минимизира ефекта от фоновия заряден ток, причинен от нереактивни процеси, като например зареждането на повърхността на електрода (двоен електричен слой). При DPV къси потенциални импулси се прилагат към системата, което помага за намаляване на въздействието на този фонов шум чрез фокусиране само върху текущите промени, които възникват по време на приложените импулси, свързани с действителни редокс реакции.

Хроноамперометрията (CA) на багрилата беше проведена с три E_{dc} : -1 V, -1.2 V и -1.5 V през интервал от 1 s за 300 s. В електрохимията, хроноамперометрията е аналитична техника, при която електрическият потенциал на работния електрод се променя стъпково и се наблюдава получените токови изменения, предизвикани от Фарадееви реакции, протичащи на електрода, като функция от времето.

При тези анализи резултатите се представят като функция на плътността на генерирания ток от времето изчислени по следната формула:

$$j = \frac{I}{S} \quad , mA/m^2$$

Способността за пренос на заряд на багрилата бе изследвана чрез електрохимична импедансна спектроскопия (EIS), проведена в същата триелектродна конфигурация. EIS

анализите бяха извършени в честотния диапазон от 100 kHz до 0,1 Hz, при приложен синусов сигнал от 10 mV и постоянен потенциал от -1 V (E_{dc}). Импеданските спектри са представени като графики на Найкуист и Боде. Графиката на Найкуист представлява импеданса при всяка честота, $Z(\omega)$, в комплексната равнина, където се измерват реален (Z') и имагинерен ($-Z''$) импеданс. Графиката на Боде описва изместването на отрицателния фазов ъгъл в градуси според приложените честоти (в логаритмична форма).

Електрохимичният импеданс е мярка за съпротивлението, което една електрохимична система оказва на променлив ток (AC) при различни честоти. Електрохимичният импеданс обикновено се измерва чрез прилагане на променлив ток към електрохимична клетка и след това измерване на тока през клетката. Да приемем, че прилагаме синусоидално потенциално възбуждане. Отговорът на този потенциал е променлив токов сигнал. Този токов сигнал може да се анализира като сума от синусоидални функции (ред на Фурие).

Всяко багрило е изследвано най-малко три последователни пъти при еднакви условия, като всеки опит започва от прясно приготвени разтвори. Средните стойности и стандартните отклонения са представени в резултатите.

За да се оценят разликите в наблюдаваното електрохимично поведение, бяха оценени енергийните нива на най-високата заета молекулна орбитала (HOMO) и най-ниската незаета молекулна орбитала (LUMO). Енергийното ниво на HOMO е получено от началния потенциал на първото окислително събитие в записаните CVs (E_{ox}^{onset}), както е описано по-рано [29] или чрез DPV, проверено в това проучване. Използвани са следните формули:

$$HOMO = -(E_{ox}^{onset} + 4.44), eV \quad (1)$$

Във формулата 4.44 произхожда от енергийното ниво на вакуума, прието в електрохимията и молекулната орбитална теория като референтна стойност спрямо електрода на стандартен водороден електрод (SHE). Енергийното ниво на вакуума се

счита за 0 eV. Потенциалът на стандартния водороден електрод (SHE) е дефиниран като 0 V по електрохимична скала, но по енергийна скала (спрямо вакуум) той има стойност -4.44 eV.

Поради тази причина, когато се измерва окислителният onset потенциал на дадена молекула спрямо референтен електрод, за да се преобразува в абсолютна енергия (сравнена с вакуума), се прибавят 4.44 eV. Нарича се още константа за привеждане към вакуумна енергийна скала, а знакът минус (–) се поставя тъй като HOMO се намира по-ниско от вакуума.

Енергийните нива на LUMO на изследваните багрила бяха изчислени с помощта на уравнение 2:

$$LUMO = HOMO + E_g^{opt}, eV \quad (2)$$

Където E_g^{opt} optical band gap представлява енергийното разстояние между HOMO и LUMO нивата на молекулата. Тя се определя експериментално чрез ръба на абсорбцията – т.е. дълговълновия ръб λ_{abs}^{onset} в UV-Vis спектъра, където започва значителното поглъщане на светлина. Този ръб съответства на енергията, необходима за прехвърляне на електрон от HOMO към LUMO. Определя се чрез следната формула 3:

$$E_g^{opt} = \frac{h \times c}{\lambda_{abs}^{onset}} = \frac{1240}{\lambda_{abs}^{onset}} \quad (3)$$

6.2 Спектрофотометрични методи – UV-Vis

Фотофизичните свойства на азобагрилата са подробно изследвани с помощта на UV-Vis спектроскопия. Използван е UV-VIS спектрофотометър (Hach-Lange), работещ в диапазона от 200 nm и 900 nm дължини на вълните. Багрилата бяха разредени до концентрации от 0.1 mM и 0.05 mM във форфатен буфер за спектроскопското изследване и измерването бе проведено в целият диапазон на апарата (Wave length scan).

Преходите на π - и n -електрони изискват сравнително ниска енергия, особено когато тези електрони са част от спрегната π -система. При такива системи се наблюдават

$\pi \rightarrow \pi$ и $n \rightarrow \pi$ електронни преходи, чийто максимум на поглъщане попада в ултравиолетовата и видимата област на електромагнитния спектър. За разлика от тях, σ -електроните се възбуждат при значително по-висока енергия, като съответните $\sigma \rightarrow \sigma^*$ преходи се регистрират във вакуумно-ултравиолетовата област (в интервала 124–140 nm).

Цветът, придаден от багрилата на получения разтвор, зависи от електронните свойства на хромофорната молекула [23]. Хромофорът е ковалентно ненаситена група като алкен, алкин, карбонил, азо, нитрил, нитро и т.н., отговорен за абсорбцията както в UV, така и във видимите области. Ако хромофорът абсорбира светлина във видимата област (400–800 nm), той изглежда оцветен. За азобагрилата цветният хромофор трябва да бъде част от конюгирана система, която се получава, когато азо групата е поставена между ароматни пръстени. Ковалентно наситени групи като амин, сулфо, карбоксилна киселина и хидроксигрупи, прикрепени към хромофор, са известни като ауксохроми и са основни заместители на пръстена при осигуряване на целеви цветове [23]. Те разширяват спрегнатата система и способстват за понижаване на енергията на електронните преходи, с което цветът на съединението се измества към по-дълги вълни (батохромен ефект).

В химията на багрилата и пигментите дори незначителни структурни модификации, като заместване на определени функционални групи или промяна на тяхното позициониране в ароматната система, могат да окажат съществено въздействие върху спектралните характеристики на съединението. Основните параметри, които се проследяват при такива промени, са положението на максимума на абсорбция ($\lambda_{\max}$) и моларният коефициент на поглъщане (ϵ).

- Хипсохромен ефект (синьо изместване) се наблюдава при изместване на $\lambda_{\max}$ към по-къси дължини на вълната. Този ефект обикновено е резултат от нарушаване или съкращаване на електронната спрегната система, което повишава енергията, необходима за електронния преход. В резултат се наблюдава посветляване на възприемания цвят.
- Батохромен ефект (червено изместване) се изразява в изместване на $\lambda_{\max}$ към по-големи дължини на вълната. Той е характерен за системи с удължено π -

спрежение или наличие на електронодонорни/акцепторни групи, които стабилизират възбуденото състояние. Това води до потъмняване или насищане на цвета.

- Хиперхромен ефект представлява увеличение на моларния коефициент на поглъщане (ϵ), което означава по-голяма вероятност за електронен преход. Този ефект се асоциира с повишена интензивност на абсорбцията и съответно по-ярко и наситено оцветяване.
- Хипохромен ефект е противоположен на хиперхромния — характеризира се със спад в ϵ , което води до намален интензитет на абсорбция и по-слаб визуален цвят. Причините могат да включват структурна дестабилизация, стерични ефекти или нарушаване на планарността на системата.

Таблица 3. Функционални групи в азобагрилата и техните ефекти в UV-Vis спектрофотометрията.

Багрило	Функционални групи	Тип на групата	Ефект върху $\lambda_{\max}$	Ефект върху ϵ	Коментар
β -Нафтол виолет	$-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_3 \text{ H}$	Ауксохроми	Батохромен ($\lambda \uparrow$)	Хиперхромен ($\epsilon \uparrow$)	$-\text{OH}$ и $-\text{NH}_2$ увеличават спрежението, засилват цвета
Оранж G	$-\text{OH}$, $-\text{SO}_3 \text{ H}$	Ауксохром / акцепторна	Батохромен ($\lambda \uparrow$)	Хиперхромен ($\epsilon \uparrow$)	$-\text{SO}_3 \text{ H}$ увеличава разтворимостта, $-\text{OH}$ усилва абсорбцията
Понсо S	$-\text{SO}_3 \text{ H}$, $-\text{OH}$	Ауксохром / акцепторна	Батохромен ($\lambda \uparrow$)	Хиперхромен ($\epsilon \uparrow$)	Комбинация от групи удължава хромофорната система
Оранж II	$-\text{SO}_3 \text{ H}$, $-\text{NH}_2$	Ауксохром / акцепторна	Батохромен ($\lambda \uparrow$)	Хиперхромен ($\epsilon \uparrow$)	$-\text{NH}_2$ повишава спрежението, $-\text{SO}_3 \text{ H}$ дава разтворимост
Метил оранж	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{SO}_3 \text{ H}$	Ауксохром / акцепторна	Батохромен ($\lambda \uparrow$)	Хиперхромен ($\epsilon \uparrow$)	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ дава силен електронен тласък към хромофора
Конго червено	$-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_3 \text{ H}$	Ауксохром / акцепторна	Батохромен ($\lambda \uparrow$)	Хиперхромен ($\epsilon \uparrow$)	Силно спрегната система $\rightarrow$ интензивно червено оцветяване

Метил оранж и Конго червено не съдържат хидроксилна група. Всяко багрило има поне една сулфо група (Метил оранж и Оранж II), β -Нафтол виолет, Оранж G и Конго червено имат две сулфогрупи – а Понсо S притежава четири сулфогрупи (Таблица 1 и 3). Конюгираните системи на азобагрилата позволяват нарастващия интензитет на електронните преходи, като по този начин произвеждат цвета на тези системи.

6.3 Квантово-химични изчисления

Енергийните позиции на HOMO и LUMO нивата определят границите на оптичния спектър. Използвайки различни нива на теорията на функционала на плътността (DFT), бяха изчислени HOMO и LUMO. Първоначално, геометрията и структурата на багрилата бяха оптимизирани на теоретично ниво B3LYP/6-31G в газова фаза. Последващите изчисления бяха извършени, за да се докаже, че намерените структури са разположени в минимума на координатната хиперповърхност (без имагинерни честоти). Изчисленията бяха извършени с търговския софтуер Gaussian 16. Структурите са визуализирани със софтуера ChemCraft. В последствие са използвани по-високи нива на квантово-химичните изчисления, достигнали до BLYP/6-311++G(d,p) като изчисленията са направени с модел на воден разтвор. Анализът на естествените орбитали на връзките (Natural bond orbital, NBO) позволява определянето на хибридизацията на атомните несподелени двойки и на атомите, участващи в орбитали на връзките.

6.4 Микробиологични методи

6.4.1 Култивиране на референтен щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* референтен щам, известен като *Lactobacillus bulgaricus* (LBB) бе предоставен от Националната банка и притежава сертификата с NBIMCC номер 1132; WDCM номер 00102 и е типов щам за вида. Препоръчана хранителна среда *Lactobacillus* MRS Broth (MRS Broth). Лиофилизираната култура бе суспендирана в 200 μ l среда MRS Broth, стабилизирана на стайна температура и култивирана в суспензия в обем 5 мл. в термостат на 37°C (първи пасаж), а след това бе посята в обем 300 ml (втори пасаж) на 37°C за 24 до 48 ч. в микроаерофилни или анаеробни условия. Инокулатът бе приготвен чрез

центрифугиране на клетките LBB при 3000 rpm за 5 мин, промити два пъти със стерилна ултрачиста вода и последващо центрофугиране при същите условия и накрая суспендиран във фосфатен буфер. Промивките и суспендирането на бактериалните клетки се осъществяват в ламинар бокс. Измерва се абсорбцията на 100 µl от инокулата разредени сто пъти във физиологичен разтвор при 600 nm. дължина на вълната за уеднаквяване на количеството клетки.

Съставът на MRS хранителна среда съдържа 20 g глюкоза, 5 g дрожден екстракт, 10 g месен бульон, 10 g пептон, 1 g детергент Tween 80, 5 g натриев ацетат, 2 g диамониев цитрат, 2 g K_2HPO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 g $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ и ултра чиста вода до 1l (pH 6,2-6,6) Рецептата за твърда среда е с добавка на 15 g агар.

6.4.2 *Образуване на биофилм*

Биофилмите са триизмерна, хетерогенна общност от микробиални клетки, затворени в екзополисахариден матрикс, която може необратимо да се прикрепи към твърди повърхности или живи тъкани. Образуването на биофилм е от голямо значение в много полезни приложения, като биокатализа, разграждане на химични замърсители в отпадъчни води, микробиални горивни клетки и биосензори. В повечето биофилми живите клетки представляват по-малко от 10% от общото съдържание, представено от матрикс (около 90%). Като цяло, матриксът на биофилмите съдържа компоненти като полизахариди, протеини и извънклетъчна ДНК, но тяхното съдържание зависи от бактериалния вид и условията на околната среда. Освен това, матриксът осигурява висока механична стабилност.

В областта на микробиалните горивни клетки образуването на биофилм се осъществява при приложено напрежение за съкращаване на времето на образуването му [30]. За всеки бактериален вид, това приложено напрежение е различно и се определя експериментално. Използването на нов бактериален вид, неизследван за екзоелектрогенна активност наложи да провеждането на експерименти с две приложени напрежения – положително (+0,4 V vs. Ag/AgCl) и отрицателно (-0,4 V vs. Ag/AgCl), всяко за четири дни. Като твърда повърхност бе използван въглероден плат. Инокулирането на MRS хранителна среда (препоръчана от доставчика на щама) бе

унифицирано и бе използвано количество LBB инокулат отговарящо на абсорбция при λ 600nm равно на 0,600. Работата с култивиране на бактерии, образуване на биофилм и електрохимични експерименти в биоелектрохимична система бе осъществявана в ламинар бокс при постоянен вертикален поток от стерилен въздух. Бактериалната концентрация на инокулата бе изчислена на базата че $A_{600} = 1$ съдържа 10^9 клетки/ мл. , т.е. в нашия случай $A_{600} = 0,607$ отговаря на $6,07 \times 10^{10}$ клетки/ мл. Използваните 350 μ l унифицирано количество в краен обем 45 мл. отговарят на $4,72 \times 10^8$ клетки/мл.

6.4.3 Тестове за антимикробна активност

Тестове за антимикробна активност на използваните багрила бяха проведени с микроорганизми от колекцията на Катедра „Микробиология” към УХТ, гр. Пловдив, които са посочени в Таблица 4. Представители на Грам-положителни бактерии *Staphylococcus aureus*, Грам- отрицателни *Escherichia coli* и дрожди *Sacharomyces cerevisiae* като представители на еукариотите.

Таблица 4. Тест-микроорганизми, използвани в дипломната работа, хранителни среди и условия на култивиране.

Тест-микроорганизми	Хранителна среда	Температура/време
Грам-положителни бактерии <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	LBG agar	37 °C / 24 h
Грам-отрицателни бактерии <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LBG agar	37 °C / 24 h
Дрожди и плесенни гъби <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	MEA agar	30 °C / 24 h

При провеждане на експериментите по дипломната работа са използвани два вида хранителни среди. LBG агарът (Luria-Bertani glucose agar, Laboratorios Conda S.A., Испания) се приготвя като 50 g от готовата субстанция LBG agar се разтварят в 1 L дейонизирана вода (pH $7,5 \pm 0,2$). Автоклавира се при температура 121 °C за 20 мин. Втората среда бе MEA (Malt extract agar, Himedia, Индия) е среда за култивиране на плесенни гъби и дрожди. Приготвя се като 61 g от готовата субстанция MEA се разтварят

в 1 L дейонизирана вода ($\text{pH } 5,6 \pm 0,2$). Автоклавира се при температура $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 15 мин.

Антимикробната активност на разтвори на багрилата във фосфатен буфер с различни концентрации е определена посредством агар-дифузионния метод в ямки. Фосфатният буфер не притежава инхибиращ ефект спрямо използваните тест-микроорганизми.

Инокулумите (суспензиите) на тест-микроорганизмите бяха приготвени предварително съгласно метода, описан по-рано от [31]. Концентрацията на жизнеспособни клетки в бактериалните и дрождевите инокулуми бе доведена до 10^8 cfu/ml , докато концентрацията на спорите в плесенните инокулуми - до 10^5 cfu/ml . Приготвените по този начин суспензии се инокулират в предварително разтопени и охладени до $45\text{--}48\text{ }^{\circ}\text{C}$ агарови хранителни среди. В стерилни петрита се разливат по 18 ml от предварително инокулираните с тест-микроорганизми агарови хранителни среди и се оставят в покой за втвърдяване на агара (1-1,5 h). След това, посредством стерилен ямкопробивач в агара се изрязват по 7 ямки с диаметър 6 mm. В ямките се накапват 60 μl разтвор на багрило в три повторения. Петритата бяха инкубирани при температурен режим в зависимост от вида на тест-микроорганизма в термостат (Таблица 4). Диаметърът на зоната на инхибиране беше измерен като общата прозрачна зона, включително диаметъра на ямката, в милиметри. Измерванията бяха извършени с шублер/линийка след 24-часова инкубация.

Минималната инхибираща концентрация (MIC) бе определена по метода на двукратните серийни разреждания. Изследваният екстракт бе разреждан двукратно в следните концентрации 10 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1.25 mM, 0.63 mM, 0.31 mM и 0.16 mM разтвори на багрилата β -Нафтол виолет, Оранже G, Понсо S, Оранже II, Метил оранж и Конго червено. За стойност на MIC се приема най-ниската концентрация на разтвора, потискаща напълно растежа на всеки тест микроорганизъм около агаровата ямка [31].

6.4.4 Сканираща електронна микроскопия

Сканиращата електронна микроскопия (SEM) бе използвана за наблюдение на образуван биофилм върху електродната повърхност на работили биоелектрохимични системи. Парчета от покритите с биофилм въглеродни електроди с размер $0,5\text{ cm}^2$ бяха взети в края на експеримента и подготвени за SEM. Бактериите бяха фиксирани в 2,5%

глутаралдехид, промити два пъти с 0,067 М фосфатен буфер, рН 7,0, дехидратирани в градуирана етанолова серия (30 %, 70% и абсолютен етанол) и изсушени под стерилна вертикална въздушна струя. Използван е сканиращ електронен микроскоп Zeiss EVO (ИЕЕС-БАН, по проект № BG16RFPR002-1.014-0009 „Развитие и устойчивост на Център за компетентност ХИТМОБИЛ“, финансиран от Програма „Научни изследвания, иновации и дигитализация за интелигентна трансформация“ 2021-2027 г., съфинансирана от Европейския съюз чрез Европейския фонд за регионално развитие).

6.5 . Биоелектрохимични системи (БЕС)

6.5.1 *Образуване на биофилм върху електродна повърхност*

Четири стерилни електрохимични клетки в три електродна конфигурация бяха инокулирани с *Lactobacillus bulgaricus* в MRS в количество отговарящо на $A_{600} = 0,607$, в които работният електрод (WE) бе въглероден плат с размери 2x2 cm (SPC-7011, 30 g/m², Weissgerber GmbH & Co.), противоелектродът (CE) бе платинова пластина с размери 1x1 cm, а референтния електрод (RE) бе Ag/AgCl в 3 М KCl. Опитът бе проведен в стерилна среда (Ламинар бокс) при постоянно подаван потенциал от -0,400 V (срещу Ag/AgCl) равняващ на -0,200 V срещу SHE за 4 дни при микроаерофилни условия. Последващо култивиране бе извършено при поляризация на електрода равна на +0,400 V (+0,600 V срещу SHE). Прилагането на потенциал бе осъществявано чрез хроноамперометрия (CA) (електричния потенциал, приложен към работния електрод спрямо референтен електрод). През определен период са провеждани електрохимични експерименти OCP, DPV, CV, и EIS.

6.5.2 *БЕС при анаеробни условия*

Електродите с образуван върху тях биофилм (Фиг. 8) бяха прехвърлени в стерилни съдове със свежа хранителна среда и анаеробни условия бяха създадени чрез наслявяване на стерилен течен парафин. След 24ч. адаптация към новите условия след генериране на ток с положителни стойности към отделните БЕС е добавян пряко приготвян разтвор на подбрани багрила в крайна концентрация 1 mM и стойностите на генерирания ток са записвани постоянно. В края на всеки експеримент биоелектродите са анализирани електрохимично. CV е провеждана със скорост на разгъване на потенциала 3 mV/s за

отчитане на електрохимичната активност на биологичния компонент на системата (бактериален биофилм). Верифицирането на електрохимичната активност на покрития с биофилм електрод бе проведена чрез EIS при различни приложни потенциали. Анализите са осъществявани с потенциостат PalmSens и мултиплексър за едновременно изпитание.



Фиг. 8. Опитна постановка: провеждани експерименти за образуване на биофилм (ляво) и изпитание на подобрите багрила като екзогенни медиатори на електронен пренос от бактериите до електрода на БЕС (дясно).

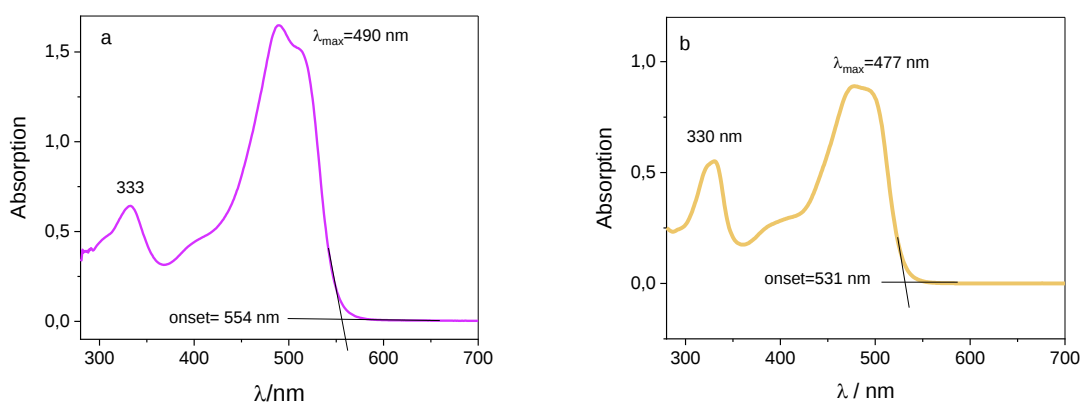
7. Резултати и дискусия

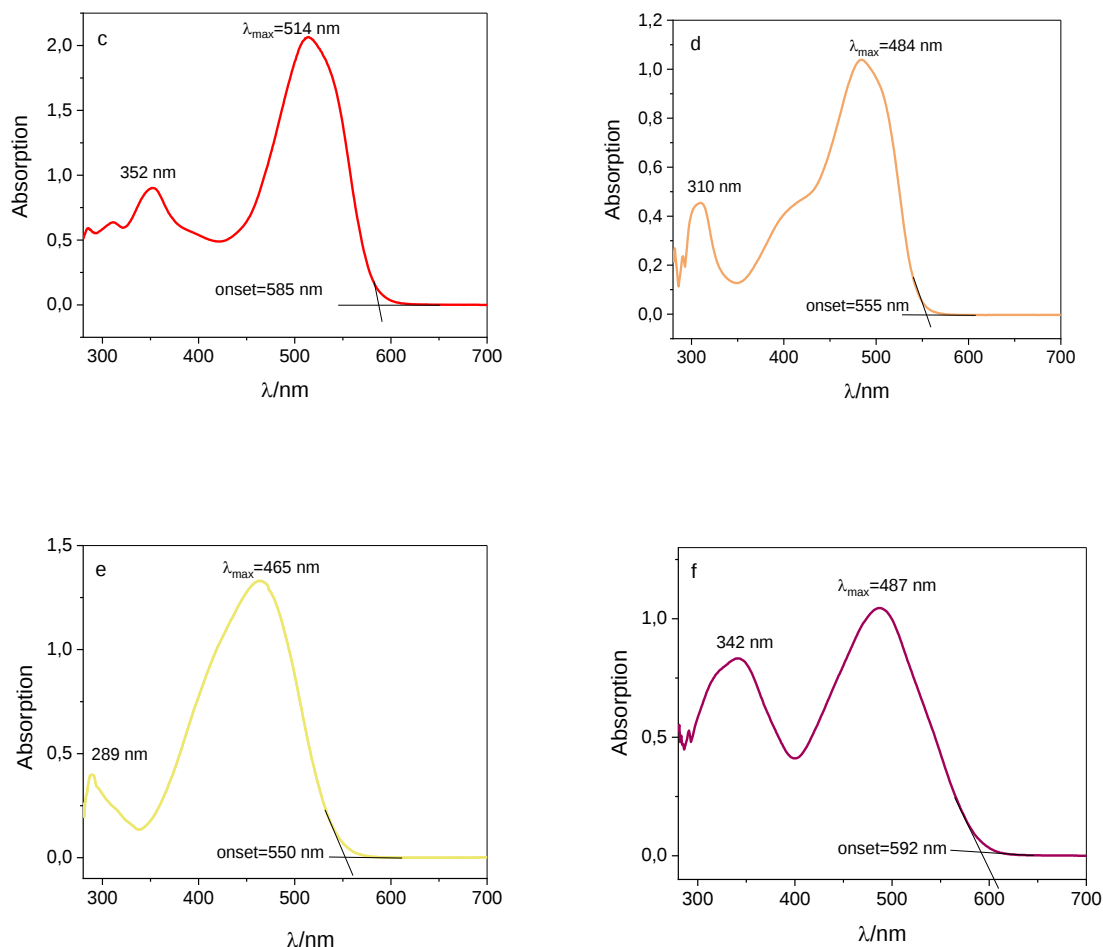
7.1 Абсорбция и фотофизични свойства

Фотофизичните свойства на азобагрилата са подробно изследвани чрез UV-Vis спектроскопия. Всички изследвани азобагрила, които образуват оцветени разтвори, показват ясно изразени абсорбционни пикове при специфични дължини на вълната (Фиг. 9). Спектрите разкриват две основни абсорбционни ленти – едната в ултравиолетовата (UV), а другата в видимата област.

Абсорбционните ленти в ултравиолетовия диапазон (289–352 nm) се дължат основно на електронни преходи от тип $n \rightarrow \pi^*$, свързани с несподелените електронни двойки на хетероатоми във функционални групи като хидроксилни, amino-, диметиламино-, нитро-, сулфо- и азогрупи. Освен това, в същия диапазон се наблюдават и $\pi \rightarrow \pi^*$ преходи, характерни за ароматните ядра и самата азогрупа.

Абсорбционните ленти във видимия спектър (465–517 nm) се дължат на вътрешномолекулен пренос на заряд от електронодонорните групи (като OH, NH_2 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), през π -спрегната система към електрон-акцепторни групи (като SO_3H и NO_2). Това обяснява интензивния цвят на багрилата. При някои багрила, като β -Нафтол виолет и Оранжев II, се наблюдават допълнителни рамене около основните пикове, което вероятно се дължи на образуването на агрегати в разтвора – димери или тримери – наред с мономерната форма. Това води до допълнителна структура в спектрите и до изместване на абсорбционните ленти.





Фиг. 9. Абсорбционен спектър на 0,1 mM багрила разтворени в 67 mM Phi, pH 7.0: а) β -Нафтол виолет; б) Оранж G; в) Понсо S; г) Оранж II; д) Метил оранж; е) Конго червено.

Началото на пиковите (λ_{abs}^{onset}) в UV-Vis спектъра бяха използвани за изчисляване на оптичната ширина на забранената зона (band-gap) съгласно уравнение 3. Това е възможно, тъй като поглъщането на електромагнитни вълни от молекула предизвиква електронно възбуждане и електронът преминава към по-високо електронно енергийно ниво от по-ниско [18]. Максималните дължини на вълната на поглъщане на светлина (λ_{max} и начални пикове λ_{abs}^{onset}) са представени в Таблица 5. Началото на дължината на вълната λ_{abs}^{onset} за регистриране на максимално поглъщане е с най-високи стойности за диазобагрилата и намалява по реда: CR>PS>OII>NV>MO>OG. Резултатите, получени за максималната дължина на вълната на абсорбция (λ_{max}), показват, че всички тествани азобагрила абсорбират във видимия зелено-син електромагнитен спектър на светлината

(Таблица 5). λ_{max} на Понсо S е изместен в зеления, докато този на Метил оранж в синия спектър. Максималната дължина на вълната на поглъщане λ_{max} намалява в реда PS>NV>CR>OII>OG>MO.

Таблица 5. Обобщение на анализирани данни от спектрофотометрични измервания. Стойности на началото на абсорбцията (λ_{abs}^{onset} , nm) и на максималните дължини на вълните (λ_{max} nm).

	1 mM багрило	λ_{abs}^{onset} , nm	λ_{max} , nm
1	β -Нафтол виолет	561,50 $\pm$ 7,50	492 $\pm$ 1,5
2	Оранж G	533,00 $\pm$ 2,00	479 $\pm$ 1,5
3	Понсо S	586,50 $\pm$ 1,50	516 $\pm$ 1,0
4	Оранж II	550,00 $\pm$ 5,00	484 $\pm$ 1,0
5	Метил оранж	550,00 $\pm$ 0,00	465 $\pm$ 1,0
6	Конго червено	592,50 $\pm$ 0,50	486 $\pm$ 2,0

7.2 Електрохимична активност на азобагрила

Електрохимичните характеристики на шестте азобагрила (четири моноазо багрила и две диазо) в концентрация от 1 mM в неутрална среда (Phi буфер) бяха изследвани, за да се свърже техният редокс потенциал с възможно взаимодействие с редокс активни видове и да се определи тяхната стабилност. Електрохимичните свойства са изследвани чрез циклична волтаперометрия (CV) и диференциална импулсна волтаперометрия (DPV). Преди това бе измервано ОСП на всяко багрило (Таблица 6). ОСПs на отделните багрила се различават, което предполага различно електрохимично поведение на всяко от тях макар и извършени при унифицирани условия като концентрация на багрилото, електродна конфигурация и др.,

7.2.1 β -Нафтол виолет

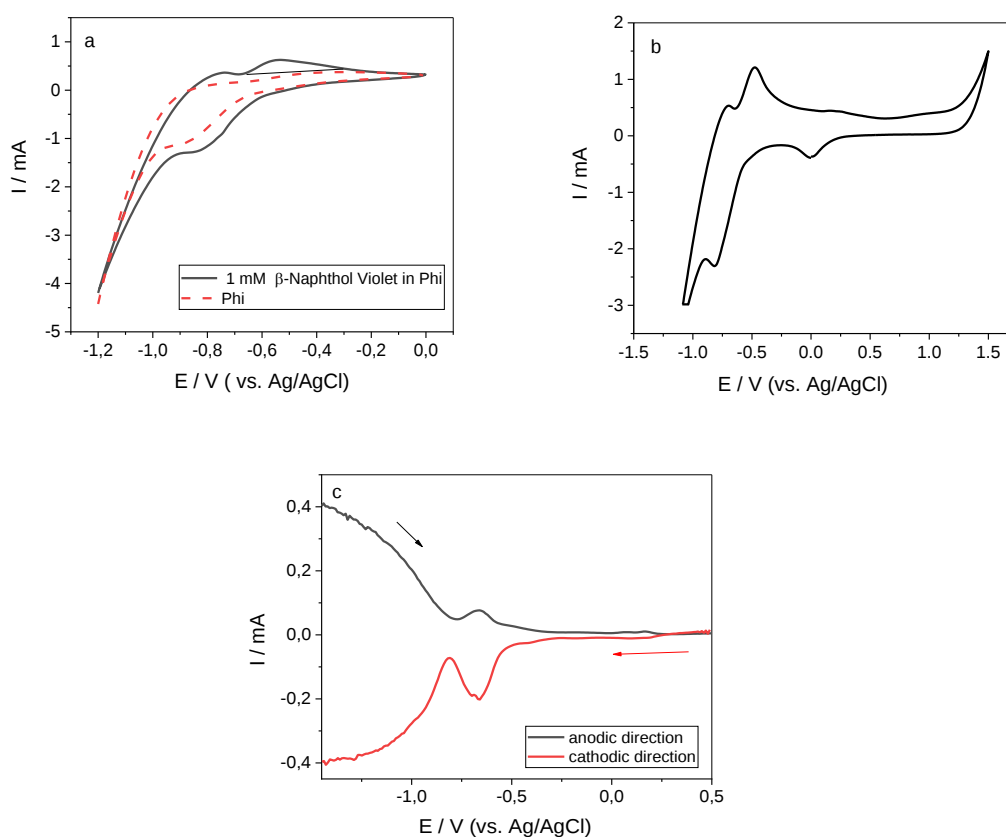
При провеждане на циклична волтамперометрия (CV) на 1 mM β -Нафтол виолет в фосфатен буфер с pH 7.0, в диапазон на потенциалите от -1.2 V до 0.0 V, е наблюдаван един окислителен пик при -0.540 V (vs Ag/AgCl), който липсва в контролната проба (Фиг.10).

При сканиране на потенциала до по-положителни стойности до $+1.5$ V, са отчетени три анодни и два катодни пика (Фиг. 10a,b). Окислителните и редукионните пикове, наблюдавани във фосфатния буфер (контролната проба), са леко изместени в положителна посока, което показва, че молекулите на багрилото взаимодействат с йоните в буфера в областта на отрицателните потенциали, граничеща със зоната, характерна за реакция на отделяне на водород. Характерните пикови потенциали, получени от CV анализа на β -Нафтол виолет и останалите изследвани багрила, са представени в Таблица 6.

За да се направи по-точна оценка на окислителните и редукионните свойства на изследваните багрила, беше разработена и въведена нова стъпка в експерименталната процедура, наречена зареждане. Този процес е характерен за зареждането на батерии. В нашия случай, външен източник на прав ток (DC) инжектира електрони в електрода по време на зареждането, което води до редукция на молекулите на багрилото на интерфейса електрод-разтвор. Възможно е електроните да бъдат привлечени към противоположно зареден край на молекулата, променяйки модела на делокализация на електроните. Зареждането на молекулите на багрилото е извършено с помощта на хроноамперометрия (CA).

Изследвани са три E_{dc} за заряда: -1 V, -1.2 V и -1.5 V. След всяко зареждане бе извършвано DPV, представляващо разреждане на молекулите на багрилото върху повърхността на електрода. Експериментите с разряд показаха видим пик на окисление при -0.666 V (vs. Ag/AgCl) потенциал, при приложен потенциал -1.0 V, което предполага, че -1.0 V е достатъчно за процедурата на зареждане. Този пик представлява фарадеевите токове и ни позволява да ги различим от капацитивните токове в системата. DPV, бе извършена в анодна и последователно в катодна посока, и показваше пикове на окисление и редукция при същия потенциал (Фиг. 10). От една страна, това потвърди обратимостта на процедурата за зареждане/разреждане и, от друга страна, дава полезна

информация за по-нататъшно определяне на молекулните орбитални енергии като алтернативен метод на CV. Резултатите показват, че токът на пика на редукция ($I_{\text{ср}}$) на β -Нафтол виолетово е около пет пъти по-висок от този на $I_{\text{ар}}$ (Фиг. 10с).

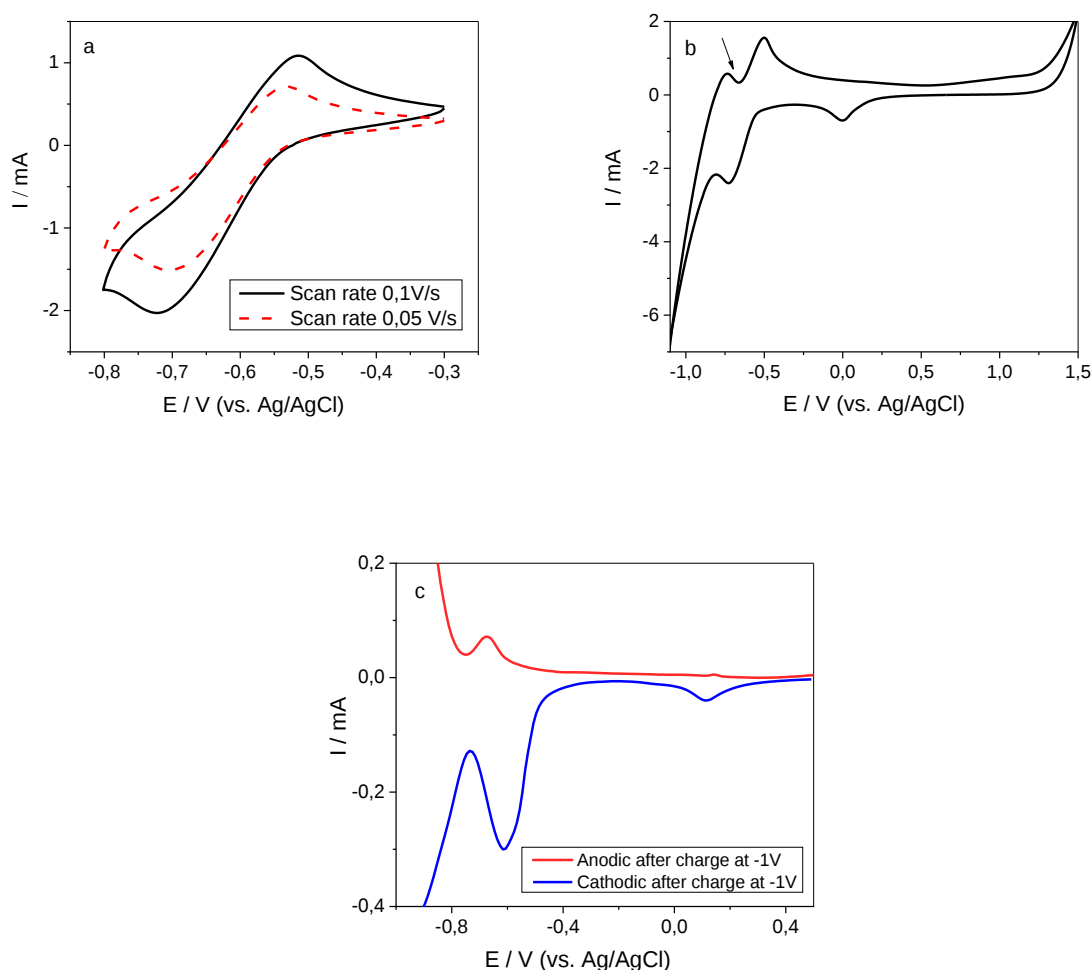


Фиг. 10. Електрохимично изследване на 1 mM β -Нафтол виолет/Phi чрез: а) CV в диапазона на отрицателния потенциал; б) CV с удължен потенциал до 1,5 V. и скорост на сканиране 100 mV/s; в) DPV, извършено след поляризация на електрода при -1 V в анодна и последваща катодна посока.

7.2.2 Оранже G

Второто анализирано багрило беше Оранже G. CV-та, проведени в областта на отрицателния потенциал, показват добре очертани пикове на окисление-редукция с квазиобратимо поведение (Фиг.11а). Подобно на β -Нафтол виолет, прилагането на CV в по-широки граници на потенциала до 1,5 V показва два пика на окисление и два редукционни пика (Фиг.11б). Пиковите на разтворителя се пренебрегват, а от анодния пик, изобразен на Фиг. 11б, потенциалът, при който започва първото окислително

събитие, наречено E_{ox}^{onset} , се използва за оценка на НОМО орбитална енергия (Таблица 7). Формалният редокс потенциал също беше оценен като средна стойност както на потенциала на върховете на окисление, така и на редукция и представен спрямо SHE (Таблица 6). DPV бе проведен с прясно приготвен разтвор на Оранж G във Phi преди поляризация и пикът на окисление бе наблюдаван при -0,275 V (vs. Ag/AgCl). След зареждане на молекулите на багрилото, анодният пик се измести в отрицателна посока и бе наблюдаван при -0,668 V (спрямо Ag/AgCl). За разтвора на OG бяха регистрирани два пика на редукция на DPV при два различни потенциала от +0,113 V и при -0,618 V (спрямо Ag/AgCl) (Фиг.11c).



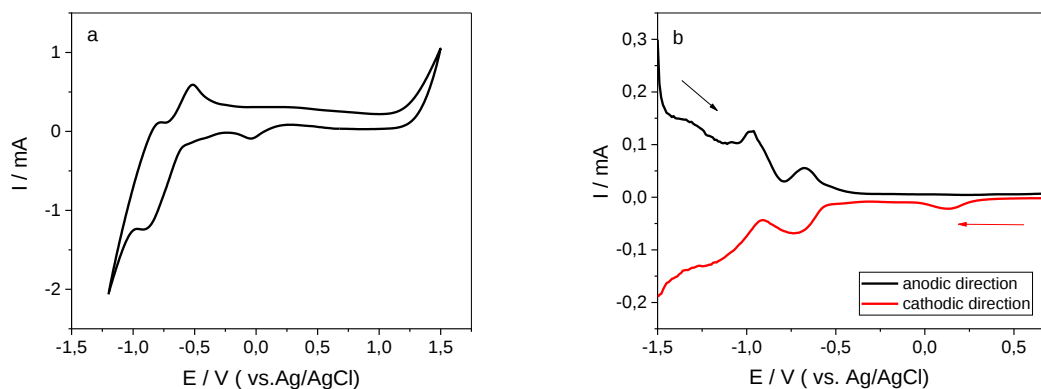
Фиг. 11. Електрохимично изследване на 1 mM Оранж G / Phi чрез: а) CV в диапазона на отрицателния потенциал; б) CV в разширени граници на потенциал до 1,5 V. и скорост

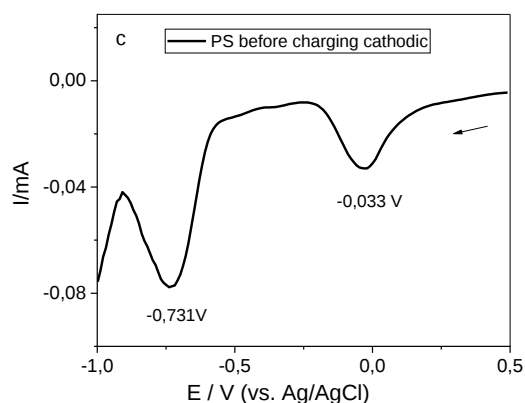
на сканиране 100 mV/s; с) DPV, извършено след поляризация на електрода при -1 V в последователно анодна и катодна посока.

7.2.3 Понсо S

Следващото анализирано багрило Понсо S е представител на диазо багрилата. Понсо S е известен с употребата си за обратимо оцветяване на протеинови ивици в Western blot мембрани. Експериментите с разтваряне на багрилото в различни разтворители показват различен интензитет на червен цвят до безцветен, доказвайки съществуването на различни форми на багрилото, които взаимодействат с околната среда по различни начини.

Цикличната волтамперометрия, проведена във Phi със скорост на сканиране 100 mV/s, показва добре дефинирани пикове на окисление и редукция, чийто ток беше 5 пъти по-висок в сравнение с останалите изследвани багрила, като достигна 575 μ A (Фиг. 12а, Таблица 6). Извършената диференциална импулсна волтамперометрия (DPV) след зареждане също показва различен профил с два пика на окисление и два на редукция. В катодна посока на DPV, пикът на редукция се появява в областта на положителните потенциали - при +0,138 V (спрямо Ag/AgCl), което представлява положително изместване с 25 mV в сравнение с редукционния пик на моноазо багрилото Оранжев G, докато същият липсва при β -Нафтол виолет (Фиг. 12b). По-отрицателният пик, регистриран след зареждане, е при -0,712 V, докато преди зареждането, катодните пикове са изместени при -0,033 V и -0,731 V (спрямо Ag/AgCl) (Фиг.12c). Тези резултати показват, че зареждането на багрилото в разтвора е било успешно.





Фиг. 12. Електрохимично изследване на 1 mM Понсо S във Phi, извършено чрез: а) CV с разширение на потенциала до 1,5 V и скорост на сканиране 100 mV/s; б) DPV, проведена след поляризация на електрода при -1 V, последователно в анодна и катодна посока; с) DPV преди поляризация.

7.2.4 Оранже II

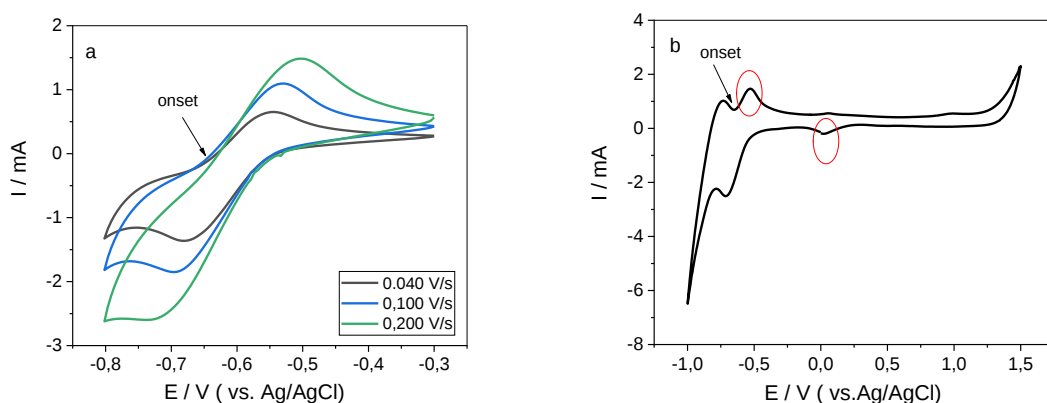
Различните съставни части или заместители влияят върху редокс поведението на хромофорни молекули. Тъй като ОГ и ОII се различават по заместителни групи и тяхната локализация ([Таблица 1](#)), е проведено и електрохимично изследване на Оранже II.

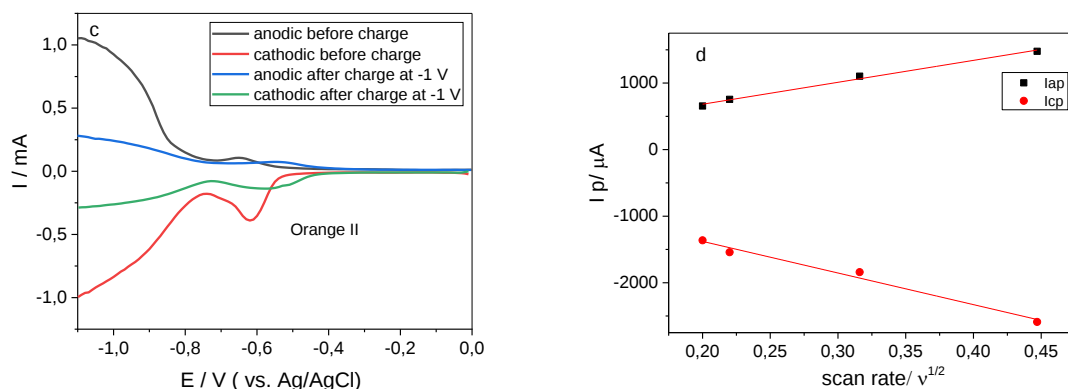
Цикличните волтампереграми на тока спрямо приложеното напрежение за азобагрилото ОII при различни скорости на сканиране са представени на [Фиг. 13а](#). Получените резултати показват, че протичат както окислителни, така и редукционни процеси, като токовете на пиковите нарастват с увеличаване на скоростта на сканиране. Тези резултати сочат, че редукционните електрохимични процеси се контролират от ограничения при преноса на маса, или агрегация на молекулите, които пречат на свободния достъп до електрода [32]. След анализа на резултатите ([Фиг. 13d](#)), графиката на която пиковия ток (I_{ap} и I_{cp}) спрямо квадратния корен от скоростта на сканиране ($v^{1/2}$) дава линейна зависимост, е потвърждение, че процесът е дифузионно контролиран. Правата на катодните пикове, обаче дава по-голям наклон, т.е. по-големи токове при същите условия. Това подсказва, че процесът не е чисто дифузионен. Вероятно се наблюдава и адсорбция на редуцираната форма върху електрода (адсорбционно контролиран) и следователно се наблюдава смесен механизъм.

При наличие на поляризация, която е външен фактор, задвижващ движението на течността, се наблюдава отделяне на газове върху повърхността на електрода, което насочва движението на багрилните молекули към определен тип конвекция. Скоростта на сканиране от 100 mV/s се оказва подходяща за анализ на багрилата, както е описано и за други багрила със стилбазолиева структура [29].

Провеждането на CV до положителен потенциал от 1,5 V позволи да се определи началният потенциал на първото окислително събитие, характеризиращо електрохимичното поведение на багрилото (Фиг. 13b). Анализите на CV, проведени при еднаква скорост на сканиране, но в различни потенциални интервали, показват, че началните потенциали, както и потенциалите на окислителните и редуционните пикове, съвпадат (Фиг. 13a,b).

Анализът на багрилото Оранжев II чрез подхода на зареждане-разреждане (charging–discharging) се оказва по-труден за изпълнение. Както се вижда от графиката (Фиг. 13c), DPV кривите, регистрирани преди зареждането, показват по-високи пикове в сравнение с тези след зареждането. Следва обаче да се отбележи, че това не възпрепятства изследването – методът беше приложен с цел по-ясно разграничаване на окислителните пикове и получаване на отчетливи резултати, необходими за изчисленията на молекулните орбитали. Данните от двете изчисления са представени в Таблица 7 за CV и Приложение I за DPV.



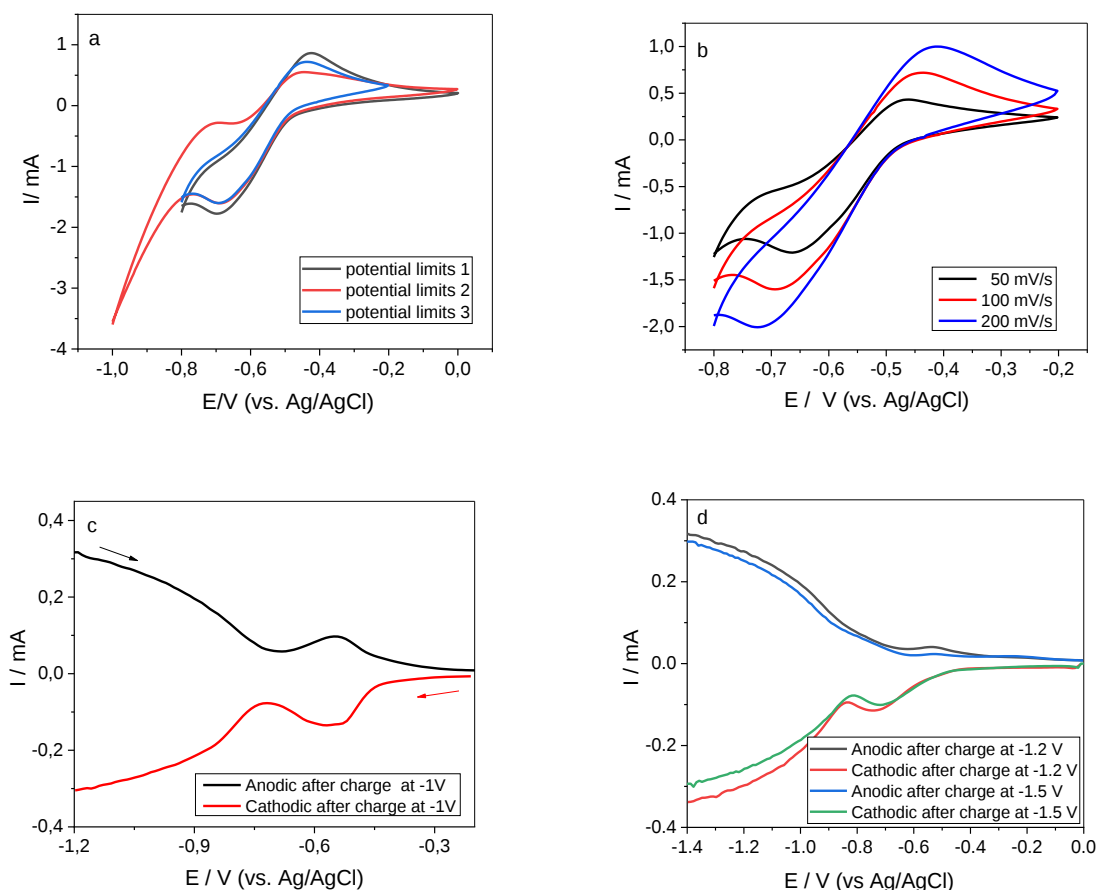


Фиг. 13. Електрохимично изследване на 1 mM Оранж II във фосфатен буферен разтвор (Phi), проведено чрез: а) Циклична волтамперометрия (CV) в областта на отрицателните потенциали, изпълнена при различни скорости на сканиране; б) Циклична волтамперометрия с разширяване на върховия потенциал до 1,5 V, при скорост на сканиране 100 mV/s; в) Сравнение на диференциална импулсна волтамперометрия (DPV), проведена преди и след поляризация на електрода при -1 V, последователно в анодна и катодна посока; г) Линейна зависимост между височината на токовия пик (аноден и катоден от корен квадратен на скоростта ($R^2_{ap}=0,99$, $R^2_{cp}=0,98$).

7.2.5 Метил оранж

Извършените CV на 1 mM Метил оранж в Phi в различни върхове на потенциала показват, че редокс активността е най-добре изразена в областта на отрицателния потенциал (Фиг. 14a). Както в случая с Оранж II, увеличаването на скоростта на сканиране води до увеличаване на токовете и потенциалът на пиковите на окисление се измества в положителна потенциална посока, докато потенциалите на редукционните пикове се изместват в отрицателна посока (Фиг. 14b). Това означава, че реакцията не е достатъчно бърза, за да следва напълно равновесие по Нернст. При висока скорост на сканиране анодният пик се измества към по-положителни потенциали което означава че е нужно повече напрежение, за да протече окисление. Катодният пик се измества към по-отрицателни потенциали - нужно е по-ниско напрежение, за да протече редукция. Симетрията насочва че процесът е квази обратим. Изчисленият срещу SHE формален редокс потенциал $E^{0'}$ е твърде отрицателен и е равен на $-0,393$ V (Таблица 6). Въпреки че моделите на CV показват квази-обратимо поведение, проведените DPV в анодни и

катодни посоки след зареждане при -1 V показват обратими пикове, описващи реакцията на приетия заряд (Фиг. 14с). Намаляването на приложения потенциал в отрицателна посока (при $-1,2\text{ V}$ и $-1,5\text{ V}$) води до намаляване на наблюдаваните пикови токове, особено на анодните, а потенциалите на катодните пикове са изместени в отрицателна посока (Фиг. 14с).



Фиг. 14. Електрохимично изследване на 1 mM Метил оранж в Phi чрез: а) Циклична волтаперометрия (CV) извършена в различни граници на разгъване на потенциала; б) Циклична волтаперометрия (CV) в областта на отрицателните потенциали, извършена при различни скорости на сканиране; в) Диференциална импулсна волтаперометрия (DPV), проведена след поляризация на електрода при -1 V ; д) DPV, проведена след поляризация на електрода при $-1,2\text{ V}$ и $-1,5\text{ V}$, съответно в анодна и катодна посока.

7.2.6 Конго червено

Второто диазо багрило, характеризирано електрохимично в това изследване, бе Конго червено. CVs, извършени в рамките на широки граници на разгъване на потенциала (от $-1,5$ до $+1,5$ V), показват, че редокс активността на Конго червено багрило е възможно да се регистрира само в границите на отрицателния потенциал, показано на Фиг. 15a. CV показва, че нейният формален потенциал е близък до този E° на Метил оранж, достигайки стойност от $-0,343$ V спрямо SHE (Таблица 6). И двете стойности са по-ниски от тези на редокс двойката $\text{NADH}/\text{NAD}^{+}$ с $E^{\circ} \cong -0,320$ V vs. SHE. Началният потенциал на пика на окисление, необходим за оценка на енергийните нива HOMO–LUMO, беше взет от DPV анализа, проведен преди зареждането (Фиг. 15b), тъй като след зареждане при -1 V височината на този пик намалява значително (Фиг. 15c).

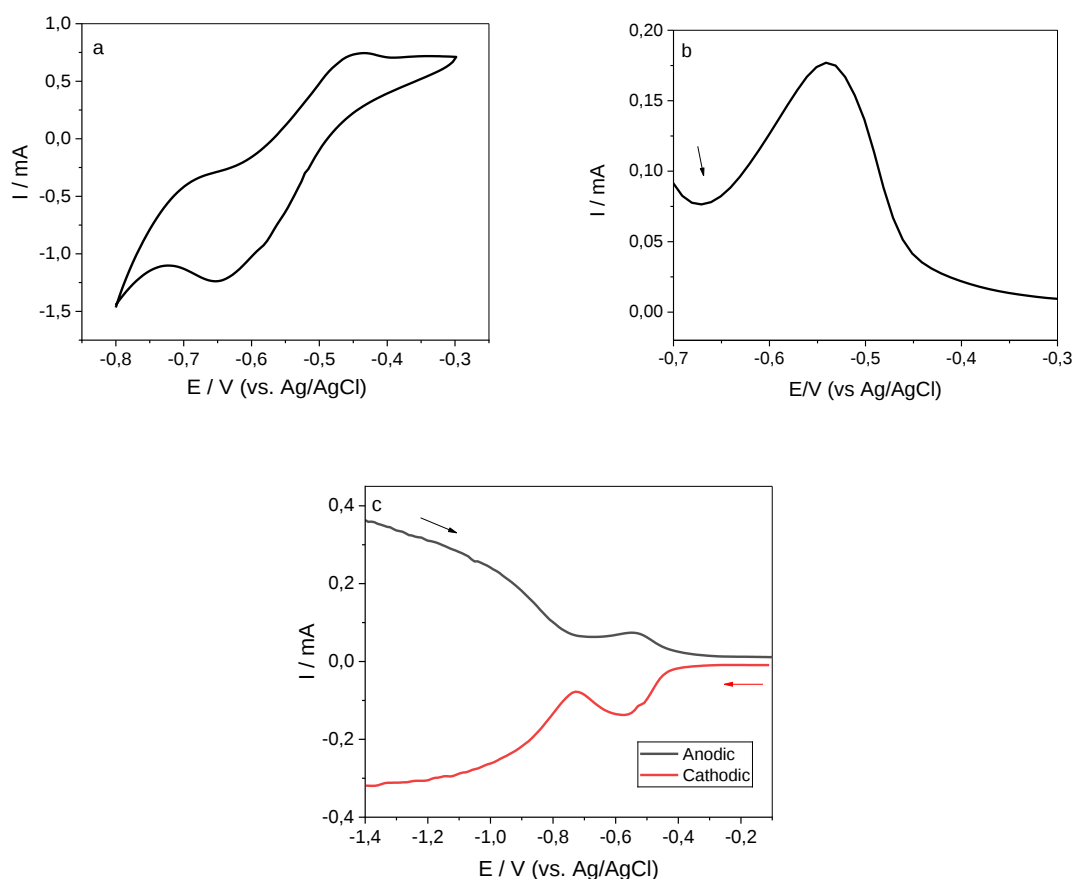


Fig. 15. Електрохимично изследване на 1 mM Конго червено в Phi чрез: а) Циклична волтаперометрия (CV) в областта на отрицателните потенциали при скорост на сканиране 100 mV/s; б) Диференциална импулсна волтаперометрия (DPV) преди

поляризация в анодна посока; с) DPV след поляризация на електрода при -1 V, извършена последователно в анодна и катодна посока.

7.3 Окислително-редукционни свойства на изследваните багрила

Електрохимичното поведение преди електрохимичната интервенция беше изследвано чрез определяне на OCP на 1 mM разтвор на всяко багрило и последваща CV от която бе изчислен формалния потенциал на багрилото спрямо SHE (Таблица 6). OCP варираше от $0,340$ V за PS до $0,592$ V за NV, което показва, че електронната плътност в конюгираните системи на изследваните багрила ще реагира специфично в електрохимичната система. Данните, извлечени от CV - анодният (E_{ap}) и катодният пиков потенциал (E_{cp}) бяха използвани за оценка на формалните редокс потенциали (E^0) (Таблица 6), докато началото на E_{ap} беше използвано за изчисляване на НОМО енергийните молекулни орбитали (Таблица 7).

Таблица 6. Измерени и анализирани електрохимични показатели на азобагрилата. Потенциалите са представени срещу SHE.

	1 mM багрило	OCP, mV	E_{ap}^{onset} , V	E_{ap} , V	E_{cp} , V	E^0 , V
1	β-Нафтол виолет	530±10	-0,478	-0,377	+0,185	-0,096
2	Оранж G	399±16	-0,451	-0,300	+0,214	-0,043
3	Понсо S	315±32	-0,501	-0,325	+0,158	-0,084
4	Оранж II	374±5	-0,438	-0,324	+0,237	-0,044
5	Метил оранж	429±2	-0,450	-0,367	-0,418	-0,393
6	Конго червено	416±20	-0,399	-0,239	-0,447	-0,343

Анодните пикови потенциали (E_{ap}) на всички багрила се наблюдават между $-0,239$ V и $-0,377$ V спрямо SHE. За разлика от тях, катодните пикове, представящи

редукционните свойства, варират и се наблюдават както в положителните, така и в отрицателните области на потенциала. Както е описано по-рано [29], сравнението на потенциалите на анодния пик показва, че окисляването на азобагрилата е най-улеснено за багрилата с най-отрицателен потенциал като Метил оранж и Конго червено. Формалният потенциал на азобагрилата намалява в реда $OG > OII > PS > NV > CR > MO$. Поради сравнително ниските им формални потенциали, MO и CR бяха сметнени за неподходящи за по-нататъшно изследване като екзогенни медиатори. Обратно, формалните потенциали на останалите азобагрила показват тяхната потенциална пригодност за бъдещи изследвания, тъй като те теоретично могат да улеснят обмена на електрони с клетъчни електронофори.

7.4 Определяне на HOMO-LUMO енергийни нива от експериментални данни

За да се разбере електрохимичната ефективност на изследваните багрила и възможността за нови приложения, получените данни от спектрофотометричните и електрохимичните изследвания бяха приложени за оценка на енергийните нива на най-високата заета молекулна орбитала (HOMO) и най-ниската незаета молекулна орбитала (LUMO) на багрилата. За органичните съединения HOMO представлява енергията, необходима за извличане на електрон от молекула, което е процес на окисление, а LUMO е енергията, необходима за инжектиране на електрон в молекула, което е процес на редукция. За това изчисление беше определена стойността на E_g^{opt} , описваща количеството светлинна енергия, необходимо за преминаване на електрони от HOMO към LUMO. Изчислените стойности на HOMO, LUMO и E_g^{opt} за багрилата са представени в Таблица 7 и 9. Енергиите на HOMO-LUMO, оценени от данните от DPV показват сравними резултати със степен на дивергенция от 0,026 V за MO, 0,067 V за CR, 0,08 V за OG и OII и 0,110 V за NV. За PS е установена разлика от 0,344 V (Приложение I).

Таблица 7. Експериментално установени HOMO-LUMO енергетичните състояния на водоразтворимите багрила. Данните са обобщение от проведените спектрофотометрични анализи и тези получени чрез циклична волтаперометрия в три последователни цикъла.

Багрило	Данни от експеримент	
	HOMO, eV	LUMO, eV
1 β -Нафтол виолет	-3,994 $\pm$ 0,023	-1,747 $\pm$ 0,023
2 Оранж G	-4,007 $\pm$ 0,017	-1,665 $\pm$ 0,011
3 Понсо S	-3,999 $\pm$ 0,043	-1,851 $\pm$ 0,032
4 Оранж II	-4,003 $\pm$ 0,030	-1,763 $\pm$ 0,004
5 Метил оранж	-4,008 $\pm$ 0,022	-1,744 $\pm$ 0,009
6 Конго червено	-4,022 $\pm$ 0,016	-1,938 $\pm$ 0,009

По-голямата разлика между енергиите на HOMO и LUMO означава, че е необходима повече енергия за да се прехвърли електрон от по-стабилната молекулна орбитала към по-малко стабилното енергийно ниво LUMO. Намаляването на HOMO-LUMO празнината увеличава скоростта на редукция на окислената молекула на багрилото от редокс двойката, което е потвърдено от редукционните пикове, показани в [Таблица 6](#). Енергийната празнина E_g^{opt} на HOMO-LUMO зоната се увеличава в ред CR<PS<NV<OII<MO<OG ([Таблица 9](#)). Диазо багрилата притежават най-малка енергийна празнина. В органичната химия, колкото по-малка е енергийната празнина, толкова по-голяма е реактивността, защото електрофилът е беден на електрони или нуклеофилът е богат на електрони. Делокализацията на електроните може да се разпростре до групи, свързани с бензенови пръстени, включително двете азо групи, които лесно се редуцират. Енергийната празнина HOMO-LUMO може да се предвиди в реакции, тъй като заместителите в молекулите на багрилата имат електроноотнемащи (акцепторни) или електрон-донорни ефекти. Електрон-донорните и електрон-акцепторните заместители играят ключова роля в определянето на реакционната способност на органичните молекули. Техният ефект се изразява чрез промяна в електронната плътност на молекулата, което пряко влияе върху нейния характер като

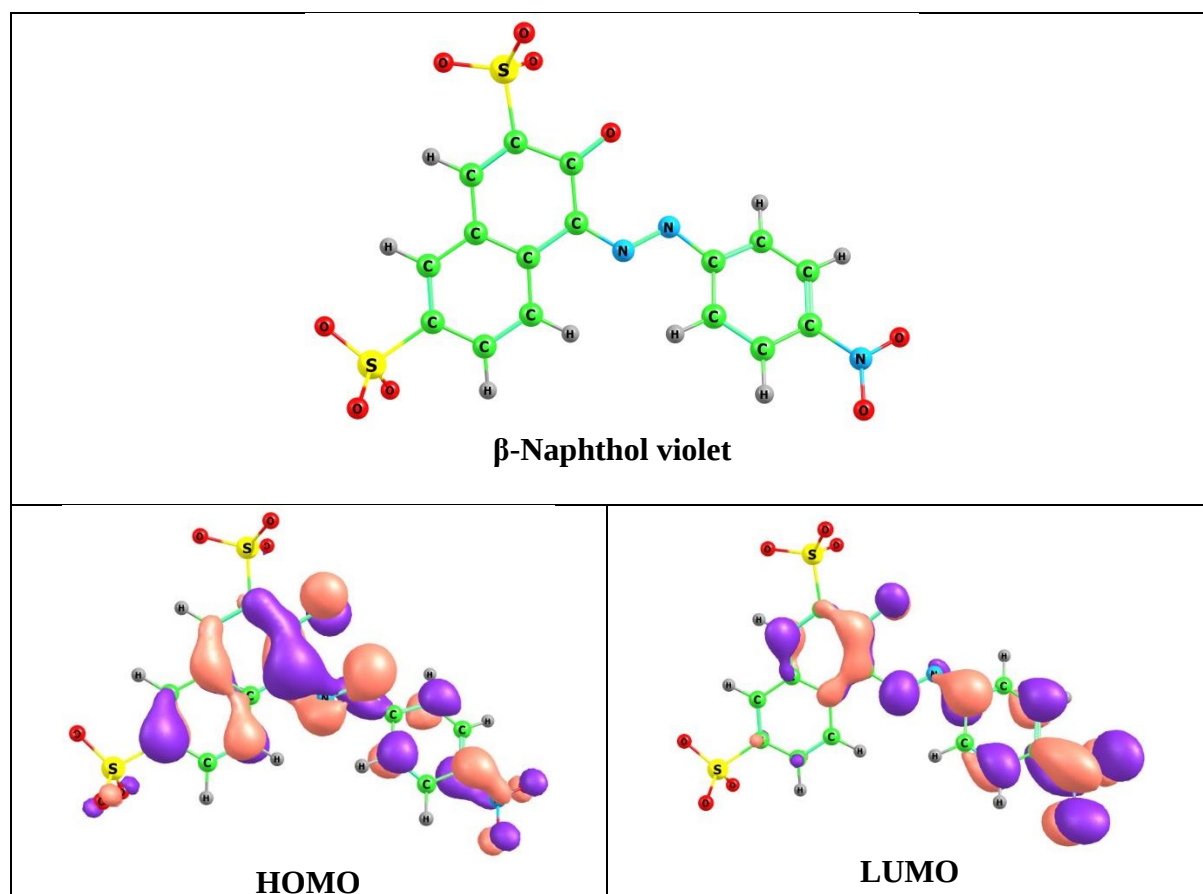
нуклеофил или електрофил. Електрон-акцепторните групи (напр. $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{CO}$, $-\text{SO}_3\text{H}$) са заместители, които изтеглят електронна плътност от системата чрез индуктивни и/или мезомерни ефекти. Това води до повишаване на електрофилния характер на определени атоми или позиции в молекулата, правейки ги по-податливи на атака от страна на нуклеофили. Освен това, тези групи стабилизират отрицателни заряди чрез делокализация или намаляване на електронната плътност в тяхната близост. В същото време те дестабилизируют положителни заряди, тъй като допълнително понижават електронната плътност в техния район. От друга страна, електрон-донорните групи (като $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OR}$, $-\text{CH}_3$) увеличават електронната плътност в молекулата чрез предоставяне на електрони посредством индуктивен и/или резонансен ефект. Това води до повишаване на нуклеофилния характер на молекулата или определена нейна част. Такива групи стабилизират положителни заряди, като ги „захранват“ с електронна плътност, и същевременно дестабилизируют отрицателни заряди поради увеличеното електронно натоварване.

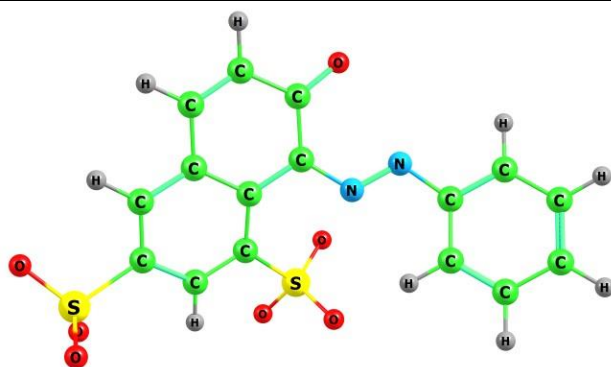
Трябва да се отбележи, че за първи път в света се прави подобно изследване с азобагрила.

7.5 Сравнение на експериментални данни с квантово химични изчисления

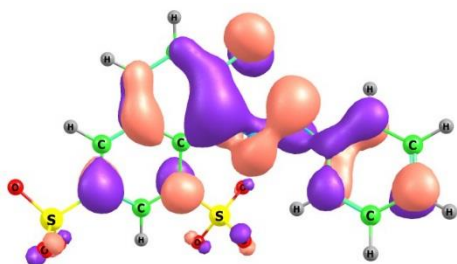
В допълнение към експериментално получените данни бяха проведени и квантово химични изчисления. Те бяха направени в две среди (вакуум и водна фаза) като бяха приложени два метода на Density Functional Theory (DFT) с хибридни функционали - B3LYP/6-31G, респ. B3LYP/6-311++G(d,p). Резултатите, показали най-близки данни до тези от експерименталните, са представени като графични изображения на [Фиг. 16](#), а резултатите от B3LYP/6-31G анализа са представени в [Приложение 2](#).

Във идеална вакуумна среда електронната плътност на багрилата (с изключение на PS, притежаваща 4 сулфо групи) бе наблюдавана върху сулфо групите в HOMO ниво и измествана към ароматните ядра в LUMO състояние. Във водна фаза бе наблюдавано различно разпределение. Електронната плътност на делокализираната система е съсредоточена върху ароматните ядра и свързващата ги азо група ([Фиг. 16](#)).

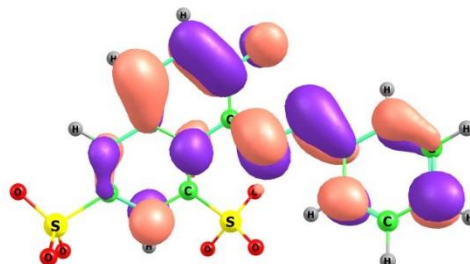




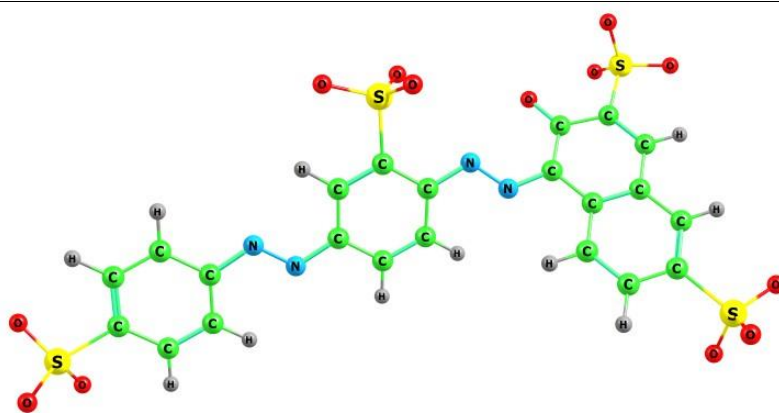
Orange G



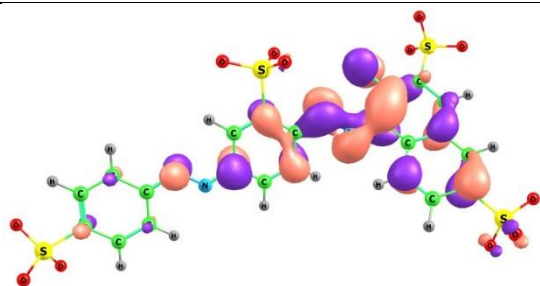
HOMO



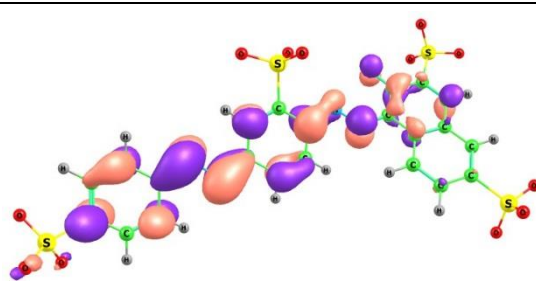
LUMO



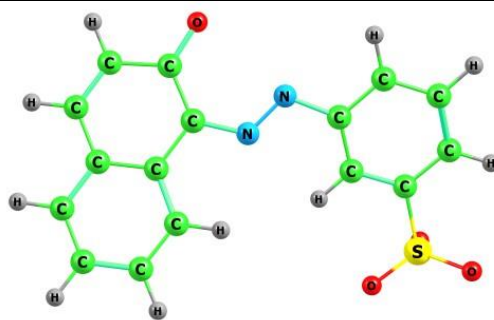
Ponceau S



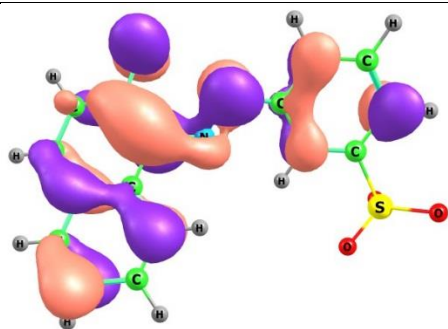
HOMO



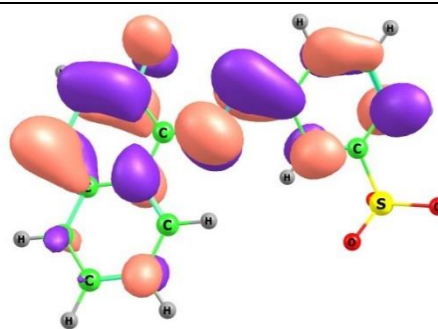
LUMO



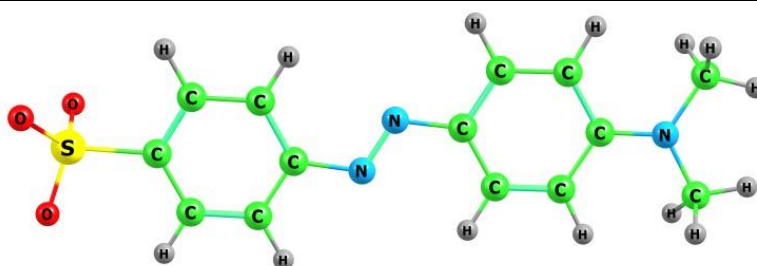
Orange II



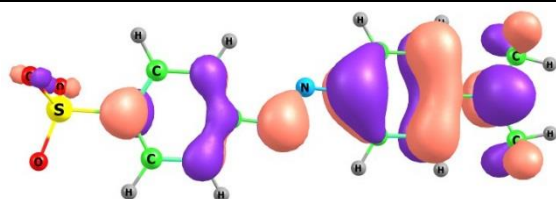
HOMO



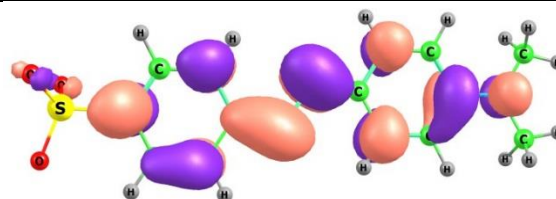
LUMO



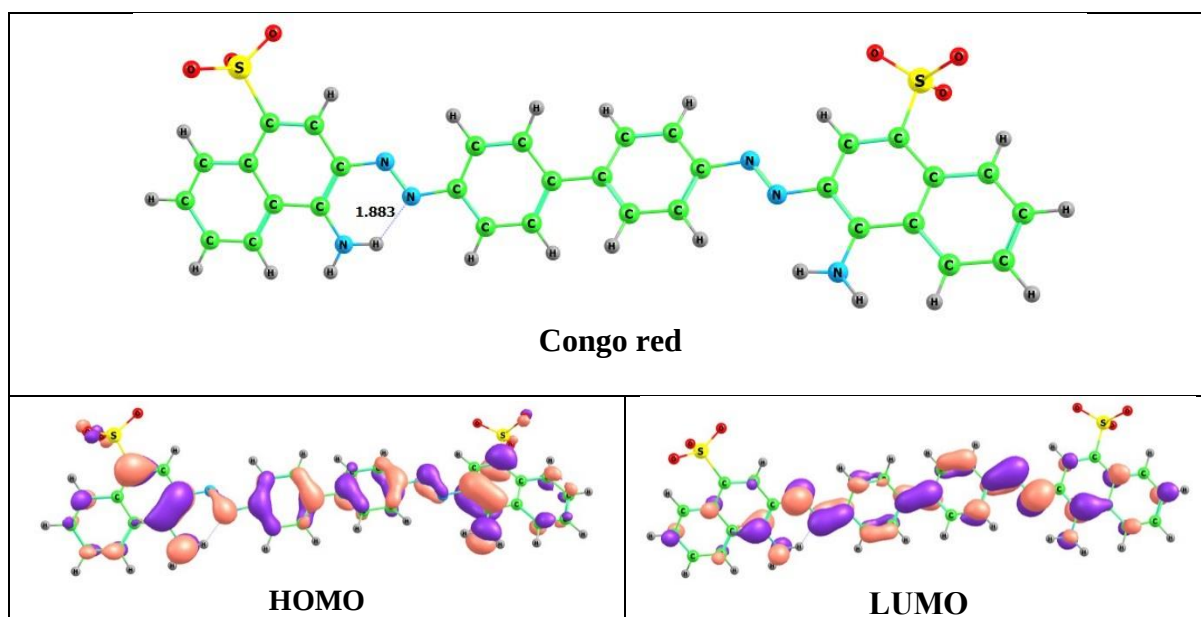
Methyl orange



HOMO



LUMO



Фиг. 16. Структурите и граничните молекулни орбитали на изследваните багрила, получени чрез метода B3LYP/6-311++G(d,p) във водна фаза.

Данните от използвания B3LYP/6-311++G(d,p) метод бяха използвани за определяне на HOMO и LUMO енергийни нива, обобщени в Таблица 8.

Таблица 8. HOMO и LUMO получени чрез квантово-химични изчисления по метода B3LYP/6-31++G(d,p) в модел на водна среда (PCM).

Багрило		Квантово химични данни в модел на водна фаза, B3LYP/6-31++G(d,p)	
		HOMO, eV	LUMO, eV
1	β-Нафтол виолет	-5,285	-3,013
2	Оранж G	-4,935	-1,897
3	Понсо S	-5,080	-2,822
4	Оранж II	-4,991	-1,986

5	Метил оранж	-5,541	-2,532
6	Конго червено	-5,541	-2,872

Както се очакваше, математически изчислените (предсказаните) НОМО-LUMO енергии се различаваха от реално измерените и изчислените. Разликата между изчислени (теоретични) и експериментални стойности за НОМО-LUMO енергийна празнина (gap) зависи от няколко фактора, като методология, ниво на теория, и природата на изследвания обект. Квантово-химичните изчисления (напр. DFT с различни функционали) често дават енергийна празнина, която е различна от експерименталната стойност. Разликите могат да варират от няколко десети до около 1 eV, в зависимост от точността на изчислителния метод. За това като следваща стъпка бе направено сравнение между експериментално определените и квантово-химично предложените енергийни празнини. Сравнението е показано в Таблица 9. Данните показват че стойностите за енергийната празнина, получени чрез двата подхода, се различаваха леко от 0,05 eV (за NV) до 0,7 eV (за OG), което е в допустимите граници за грешка в енергийната празнина, т.е. е сравнима [33]. Това предполага, че резултатите, получени от експерименталните тестове за определяне на зоната на енергийната празнина между НОМО и LUMO, са надеждни (Таблица 9).

Таблица 9. Сравнение на данните получени за зоната на енергийната празнина по експериментален път и квантово-химични изчисления.

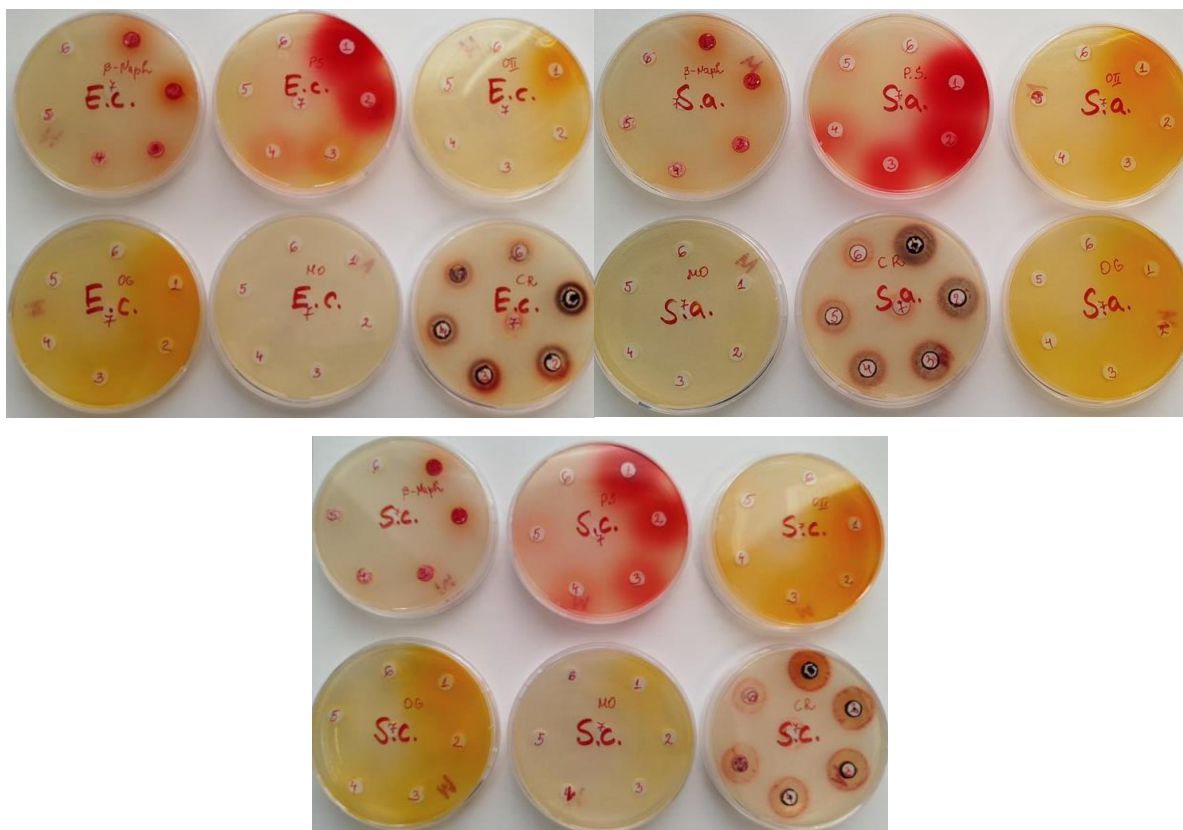
	Багрило	Данни от експеримент , eV	Данни от квантово химични изчисления, B3LYP/6- 31++G(d,p), eV
		E_g^{opt}	$E_g^{opt} = E_{LUMO} - E_{НОМО}$
1	β-Нафтол виолет	2,223±0,015	2,272
2	Оранж G	2,331±0,004	3,038

3	Понсо S	2,117±0,003	2,259
4	Оранж II	2,244±0,010	3,004
5	Метил оранж	2,255±0,000	2,847
6	Конго червено	2,094±0,001	2,669

Лекото разминаване в данните може да се дължи на това, че изчисленията използват модел на полярна среда (PCM) за вода, което е приближение на солватационните ефекти. Фосфатният буфер, използван в експеримента, има различен състав, йонна сила и рН, което променя взаимодействията между багрилото и средата. Тези фактори могат да влияят на спектралните свойства чрез различни солватационни и йонни ефекти, които трудно се моделират напълно в квантово-химичните изчисления. Буферът може да индуцира специфични взаимодействия като водородни връзки, йонни асоциации или агрегати, които променят електронната структура и абсорбцията на багрилото. В реалните условия молекулите са подложени и на топлинно движение, което води до разпределение на конформации и фина структура на спектъра, невключени в статичните изчислителни модели.

7.6 Антимикробна активност на азобагрилата

Едно от основните изисквания дадено багрило да бъде използвано като екзогенен медиатор е то да не е токсично към използвания биокатализатор. Това обуслови следващия етап от работата, а именно провеждането на тестове за антимикробна активност. Бяха направени падащи разреждания на разтворите на багрилата и тестовите направени с три вида микроорганизми - Грам-отрицателни *Escherichia coli*, Грам-положителни – *Staphylococcus aureus* и дрожди *Sacharomyces cerevisiae* (Фиг. 17).



Фиг. 17. Петрита с твърда агарова среда, всяко които с направени ямки с въведено багрило в намаляваща концентрация (6 багрила) и щрих от микроорганизми както следва: *Escherichia coli* (E.c) *Staphylococcus aureus* (S.a.), *Sacharomyces cerevisiae* (S.c.)

Антимикробната активност е изследвана чрез прилагане на дифузионния метод с ямки като са използвани тест култури от грам-положителни, грам-отрицателни микробни клетки и дрожди. Резултатите показаха че при 5 от 6-те багрила не се наблюдава антимикробна активност и това важи за трите представителя на тестваните микроорганизми *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, и *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Единствено диазо багрилото Конго червено (CR) показва зони на стерилност (несъвместимост) дори и при ниски нанесени концентрации и с трите представителя като диаметъра намаляваше в посока дрожди, Грам-положителни и Грам-отрицателни. Минималната инхибираща концентрация бе извършена по метода на двукратните серийни разреждания и използване на дифузионния метод с ямки [34] като тестваните концентрации от багрилата бяха 10 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1.25 mM, 0.63 mM, 0.31 mM и 0.16 mM (Таблица 10). Бе установено, че

CR потиска развитието на дрождите в концентрация от 1.25 mmol/l, а по-ниските концентрации водят до умерено инхибиране на растежа. Така CR отпадна от списъка на багрилата използвани в последващи биотични тестове.

Таблица 10. Изследване на антимикробната активност чрез прилагане на дифузионния метод, с широчина на стерилна зона в mm.

		10 mM	5 mM	2,5 mM	1,25 mM	0,63 mM	0,31 mM	0,16 mM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	CR	10	10	9	9	9	8	-
	MO	-	-	-	-	-	-	-
	OG	-	-	-	-	-	-	-
	O II	-	-	-	-	-	-	-
	PS	-	-	-	-	-	-	-
	β-NV	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CR	11	11	11	10	9	-	-
	MO	-	-	-	-	-	-	-
	OG	-	-	-	-	-	-	-
	O II	-	-	-	-	-	-	-
	PS	-	-	-	-	-	-	-
	β-NV	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	CR	20	20	19	18	17	16	13
	MO	-	-	-	-	-	-	-
	OG	-	-	-	-	-	-	-
	O II	-	-	-	-	-	-	-
	PS	-	-	-	-	-	-	-
	β-NV	-	-	-	-	-	-	-

7.7 Екзоелектрогенна активност на *Lactobacillus bulgaricus* 1132

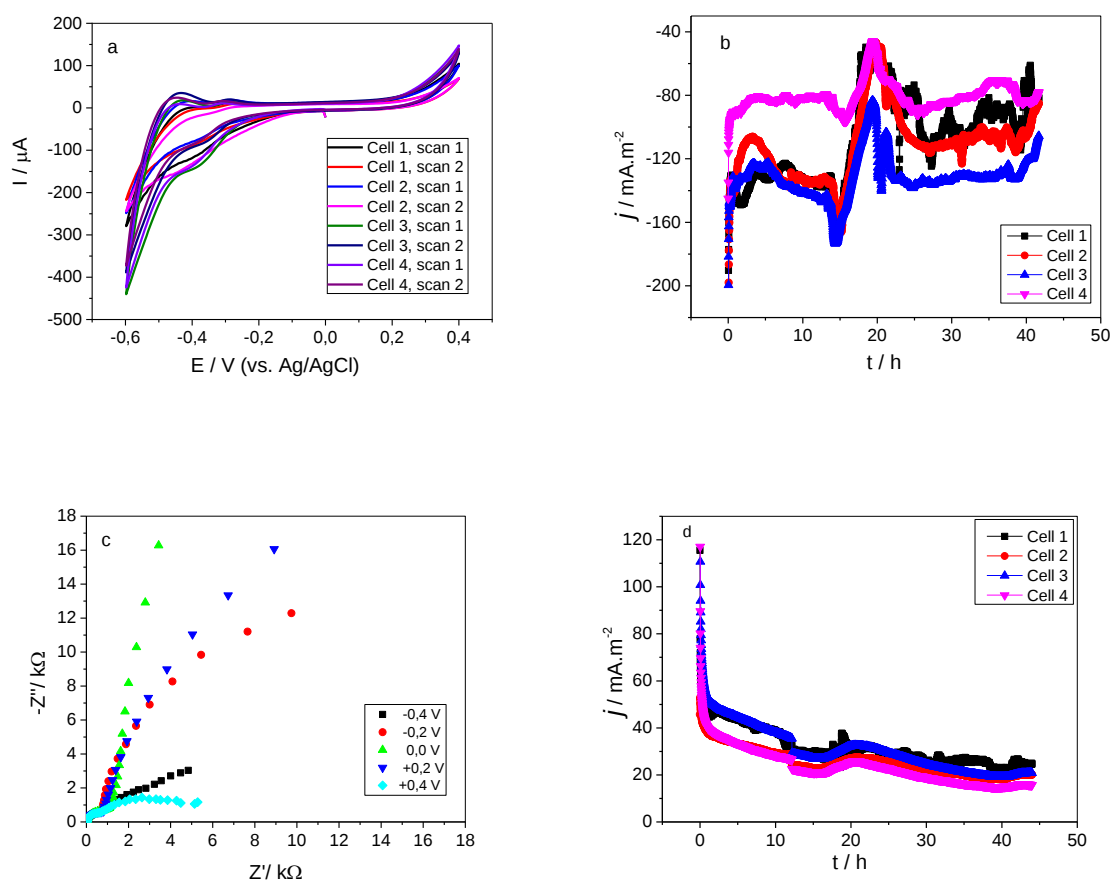
Едни от най-известните пробиотични бактерии, основни за направата и съдържащи се в българското кисело мляко бе избран за електрохимичните изследвания. Въпреки огромното му значение за биотехнологичното производство, досега референтния типовец *Lactobacillus bulgaricus* 1132 не е изследван относно електрохимична активност. Това бе мотивация *Lactobacillus bulgaricus* 1132 да се изследва като биокатализатор в БЕС.

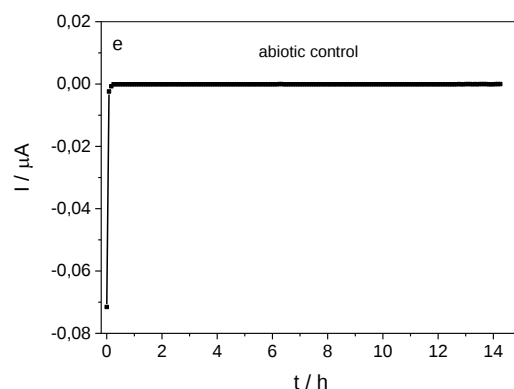
Едно от основните предимства при използването на триелектродна електрохимична клетка в съчетание с хроноамперометрия е възможността за поляризация на работния електрод. Това се постига чрез прилагане на контролирано електрично напрежение спрямо референтния електрод. Когато работният електрод бъде поставен при отрицателен потенциал, и се следи протичащият ток, знакът на тока (положителен или отрицателен) отразява посоката на електронния поток. Това от своя страна дава информация дали микроорганизмите отдават или приемат електрони от електрода, т.е. дали действат като електронни донори или електронни акцептори. В литературата има противоречиви данни за това при кои напрежения бактериите трябва да се тестват за екзоелектрогенност. Затова за всеки нов вид и щам трябва да се изследват експериментално. Когато бактериите дават отрицателен ток при отрицателни приложени напрежения означава, че те могат да приемат електрони, т.е. са електрофили. Екзоелектрогените, наричани още електрогенни бактерии, имат свойството да отдават електрони на външен акцептор на електрони, като например твърд електрод (обикновено анод). Процесът, който протича, е аноден извънклетъчен (екстрацелуларен) електронен пренос (аноден ЕЕП). Тази функция е в основата на микробиалните горивни клетки, чрез които бактериите в процеса на окисление на субстрат генерират електричество.

7.7.1 Култивиране при поляризационни и микроаерофилни условия

Преди експеримента, измереното ОСР варираше между 0,06 и 0,07 V, показващи че конфигурацията на електродите е правилна. В началото бе проведена и CV със скорост на разгъване на потенциала 10 mV/s (Фиг. 18a), и последваща поляризация при -0,400 V (срещу Ag/AgCl) за 45 ч. (Фиг. 18b) в условия без активно аериране (микроаеробно). Отрицателните стойности на генерирания ток показват че *Lactobacillus bulgaricus* 1132

притежава електрофилни свойства, още повече промяната на стойностите в положителна посока около 20 ч. демонстрира възможността му и за отдаване на електрони. За установяване на подходящите условия за осъществяване на ЕЕП, бе проведена импедансна спектроскопия при различни приложени напрежения (Фиг. 18с). Резултатите показват най-добър пренос на заряд (полукръг с най-малък диаметър) при приложено напрежение с постоянен ток ($E_{dc}=+0,4$ V). Тъй като импедансът показва пренос на заряд, който може да протича в двете посоки (от и към електрода), за да разберем дали бактериите осъществяват ЕЕП към електрода бе проведена СА при +0,4 V за следващите 45 ч. от култивирането им в електрохимична клетка (Фиг. 18d).





Фиг. 18. Електрохимични изследвания на *Lactobacillus bulgaricus* 1132 в хранителна среда: а) CV (WE C felt 4 cm², CE - Pt plate, RE Ag/AgCl) след 2 часа и 20 мин адаптационен период на бактериите в 4 три-електродни клетки и хранителна среда при микроаеробни условия, 2 scans, 10 mV/s.; б) СА при -0,4 V в началото; в) EIS, след поляризацията при -0,4 V при различни E_{dc} потенциали, честоти от 50 kHz до 0,01 Hz, E_{ac}= 0,01 V; д) СА при +0,4 V; е) Хроноамперометрично изследване на електрохимичната система при отсъствие на бактерии (абиотична контрола).

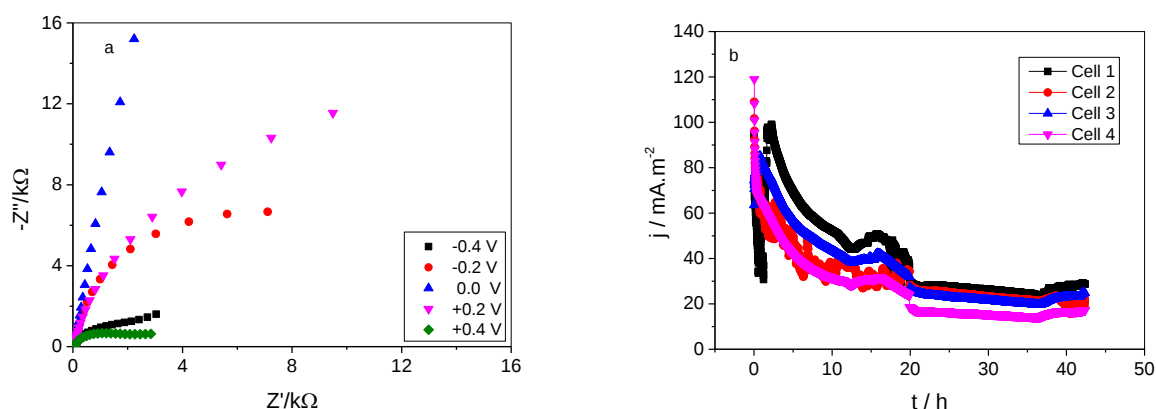
Генерираният от БЕС електричен ток е положителен, което насочва, че освен електрофили, *Lactobacillus bulgaricus* 1132 могат да отдават електрони до твърд електронен акцептор като електрода, т.е. да осъществяват екстрацелуларен електронен пренос. При тестване в абиотични условия, т.е. без бактерии в стерилна среда, бяха отчетени нулеви стойности на електричен ток (Фиг. 18е), с което бе доказан приносът на биологичния елемент за получаваните електрически характеристики.

За първи път е доказано, че *Lactobacillus bulgaricus* 1132 е нов екзоелектрогенен бактериален вид.

7.7.2 Култивиране при поляризационни и анаеробни условия

В областта на МГК е прието, че анодът ще приема електрони от биокатализатори при анаеробни условия поради способността на екзоелектрогените да използват външни за тях крайни електронни акцептори при липса на кислород. Затова следващият етап от експериментите бе провеждан в анаеробни условия. Наред с това поляризацията в

анаеробни условия води до по-бързото образуване на биофилм върху електродната повърхност, съкращаваща времето от почти месец до 4 дни [30]. Тъй като целия електролит, съдържаща хранителна среда, отпадни продукти от метаболизма на клетките и самите бактерии бяха отстранени и електродите промити, резултатите, вкл. плътността на тока показани на Фиг. 19 показват данните от биоелектрода, т.е. приносът на биологичния компонент от биофилма.



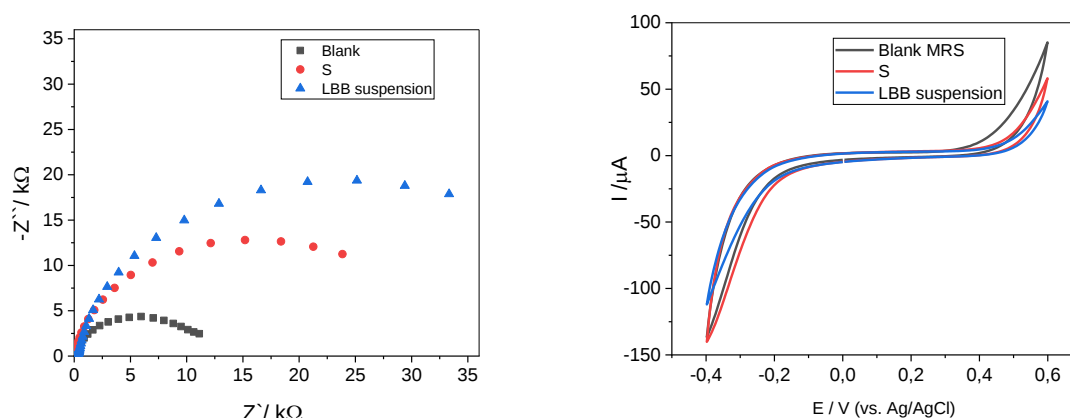
Фиг. 19. а) EIS – Никуист плот на образуван биофилм в електролит от свежа хранителна среда; б) СА при $E_{dc} = +0,4 \text{ V}$.

7.7.3 Ендогенни медиатори на електронен пренос

Някои от екзоелектрогенните бактерии, като *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Geobacter sulfurreducens* са в състояние да синтезират и секретират окислително-редукционни молекули като флавини, пиоцианин и външно-мембранны цитохроми, които могат да се редуцират във вътрешността на бактериите, да преминат през клетъчните мембрани и да достигнат до анода на МГЕ където да се окислят и се върнат в бактериите за нов цикъл на пренос на електроните. Тези молекули действат като електронни преносители и оформят така нар. индиректен механизъм на ЕЕП типичен за микроорганизми, расли в суспензия.

След фракциониране на събраната от работили електрохимични клетки суспензионно присъствала култура, получената надутаечна фракция от изтощена хранителна среда (S), събраните и разтворени в еднакъв обем утаени бактериални клетки

бяха анализирани електрохимично и сравнени с резултатите, получени с контролна проба (стерилна неизползвана хранителна среда (MRS)). Наблюдаваните разлики между изтощена (използвана) хранителна среда и свежата такава се дължи на отпадните продукти на бактериите култивирани в поляризационни условия. Най-затруднен пренос на заряд (най- голям диаметър на полукръга) показват суспензионните клетки (Фиг. 20), но все пак ни насочват към това че през клетъчната стена тези Грам-положителни бактерии могат да преминават електрони. Проведените CV показват редукционните възможности при потенциали по-отрицателни от $-0,2$ V и окислителните при потенциали по – положителни от $+0,4$ V, като и двата процеса са най-малки в суспензионната фракция. Окислително- редукционни пикове типични за ендогенни медиатори не бяха открити.

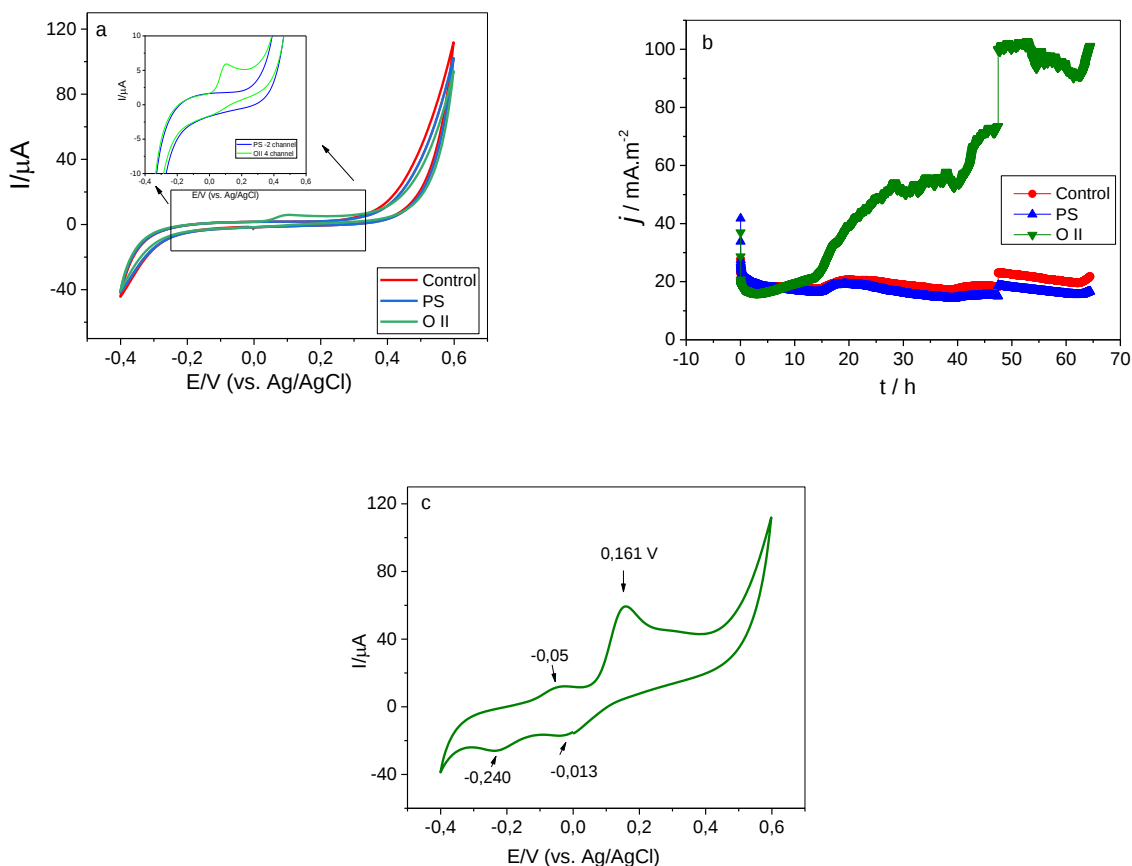


Фиг. 20. Електрохимични изследвания на фракции – надутаечна течност - употребена среда, утаени и суспендирани бактериални клетки, сравнени с контрола (свежа хранителна среда) : а) EIS (Никуист плот); б) CV.

7.8 Азобагрила като екзогенни медиатори в БЕС

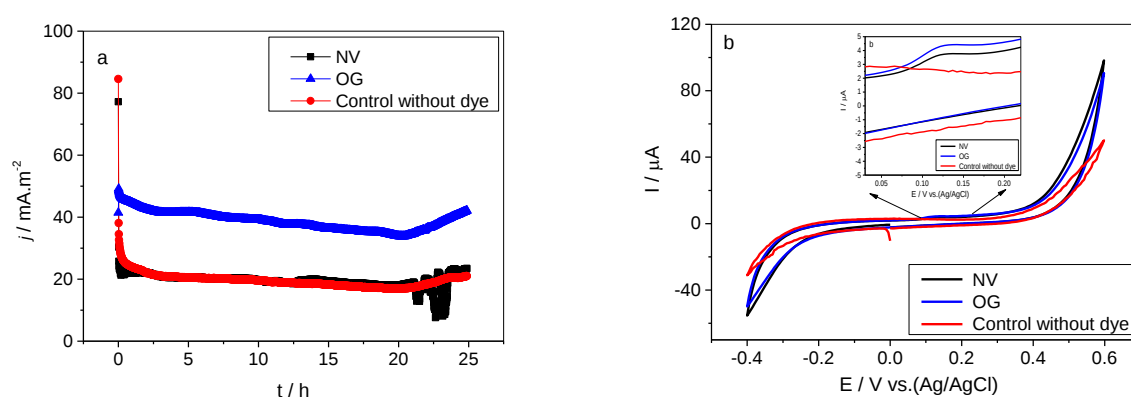
За да се проверят възможностите на ново изследвана бактериална култура *Lactobacillus bulgaricus* 1132 да достигне по-високи стойности на генерирания ток, се добавят биосъвместими, редокс-активни вещества. От изследваните азобагрила бяха подбрани като подходящи четири багрила – OII, PS, NV, и OG.

Прясно приготвени, стерилини, буферни разтвори на тези багрила бяха добавяни в крайна концентрация 1 mM към електрохимични клетки с вече образуван биофилм *Lactobacillus bulgaricus* 1132 върху электродната повърхност (наричан биоанод). Направените циклични волтамперометрични анализи (Фиг. 21a) показват наличие на окислителен пик единствено за пробата с ОII. Култивирането бе извършено при същите условия и генерирания ток - записван във времето (Фиг. 21b). След 68 ч. бе установено 5-кратно увеличение на тока при добавено ОII, докато PS не влияеше на електрическия ток и бе съизмерим с контролните проби без багрила. Резултатите от проведеното CV в края на експеримента, показва над 10 пъти по-висок ток на анодния пик, като бе регистрирана и втора окислително-редукционна двойка (Фиг. 21c).



Фиг. 21. Електрохимичен анализ на покрит с биофилм анод в присъствието на О II и PS а) CV начално, скорост на разгъване на потенциала 3 mV/s, второ сканиране; б) СА, плътност на тока спрямо времето; в) CV след 68 часа поляризация с ОII.

Опити бяха проведени и с останалите две багрила, като резултатите показаха, че почти двойно увеличение на тока се получава при добавяне на OG, докато NV дава резултати съизмерими с тези на контролата (биоанод без багрила) и не е подходящ за използване като екзогенен медиатор (Фиг. 22a). Проведените CV и на двете багрила бяха сходни с тези на контролната проба без бои. Това се наблюдава често при багрила, при които зарядът се акумулира капацитивно, без ясно изразена редокс двойка (Фиг. 22b).



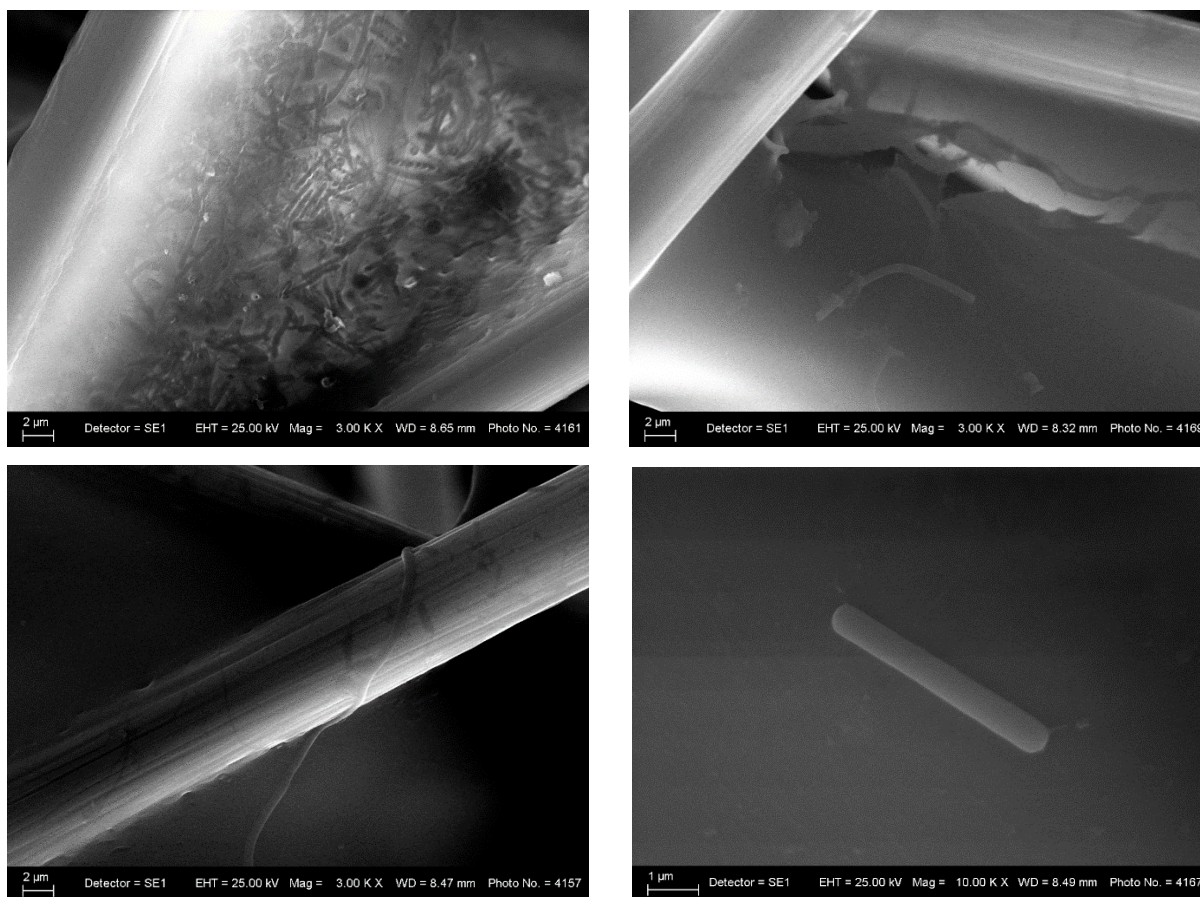
Фиг. 22. Електрохимичен анализ на покрит с биофилм анод в присъствието на NV и OG а) СА при +0,4 V; б) CV след поляризация, 3 mV/s.

7.9 Микроскопско наблюдение на *Lactobacillus bulgaricus* 1132

В края на серията опити парченца от електрода бяха подложени на наблюдение чрез сканираща електронна микроскопия (SEM). Изображенията са показани на Фиг. 23. Резултатите потвърдиха образуването на бактериален биофилм върху електродната повърхност при поляризация (Фиг. 23a), както това че LBB образува екстрацелуларен матрикс (Фиг. 23b). В отделни полета бяха забелязани значително удължени клетки (Фиг. 23c), което би могло да се дължи на електрофилността и електрогенността на LBB, доказани в това изследване. При 10 000 пъти увеличение на Фиг. 23d е показана единична бактерия със пили от двата края. Задебелението наблюдавано в края на пилите върху въглеродното влакно сочи, че тези пили са закрепени и вероятно служат като средство за комуникиране с електрода и биха участвали в пренос на електрони. Този механизъм е описан за други бактериални видове [35]. Например, професор Уве Шрьодер е допринесъл значително за разбирането на механизмите на извънклетъчния

електронен пренос (ЕЕП) при *Geobacter sulfurreducens* [11]. Той и екипът му доказват ролята на мултихемовите цитохроми и електрично проводимите пили (е-пили) за улесняване на директния електронен пренос към твърди акцептори на електрони (електроди). Наскоро наличието е-пили бе доказано и за Грам-положителни бактерии *Paenibacillus dendritiformis* MA-72 [18].

Като обобщение може да се каже, че са намерени подходящи условия (анаеробни и приложно напрежение) за образуване на биофилм върху анода. В състава на биофилма участват и електрично проводими пили. Установен е директен механизъм на ЕЕП на *Lactobacillus bulgaricus*.



Фиг. 23. SEM изображения на *Lactobacillus bulgaricus* култивиран в електрохимична клетка при поляризация: а) бактериален биофилм върху влакно от въглероден плат; б) видим екстрацелуларен матрикс; в) удължена бактерия; г) бактерия с е-пили.

8. Изводи

1. Шестте изследвани азобагрила □-Нафтол виолет , Оранж II, Метил оранж, Оранж G, Конго червено, Понсо S проявяват редокс активност, която може да се отчете чрез CV и DPV.

2. Определеният формален потенциал на багрилата показва, че □-Нафтол виолет, Оранж II, Оранж G и Понсо S могат да обменят електрони с клетъчни електронофори, докато този на Метил оранж и Конго червено е твърде отрицателен (под 0,340 V) и ги прави неприложими в БЕС.

3. От шестте багрила единствено Конго червено проявява антимикробни активност особено изразена срещу еукариоти. Наред с ниския му формален потенциал, това го определя като непригоден екзогенен медиатор на електронен пренос.

4. Методиката за експериментално определяне на HOMO-LUMO енергийни нива дава надеждни резултати, които са в границите на допустимото отклонение от теоретично изчислените.

5. Референтният щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* 1132 е нов екзоелектрогенен бактериален вид и може да се използва като аноден биокатализатор проявяващ директен механизъм на електронен пренос (биофилм).

6. Две от изследваните азобагрила могат да се използват като екзогенни медиатори на електронен пренос до анода на БЕС като Оранж G води до двукратно увеличение, а Оранж II – до петкратно увеличение на генерирания ток.

9. Основни приноси

1. За първи път са изследвани електрохимично шест азобагрила. Определени са формалните им потенциали и тяхната биосъвместимост.
2. Разработена е методика за изчисляване на HOMO-LUMO енергийни нива на азобагрила от експериментални данни.
3. Анализирани по отношение на екзоелектрогенност е нов бактериален вид и са верифицирани условията за ЕЕП
4. От четирите азобагрила определени като възможни екзогенни медиатори, две Оранжев G и Оранжев II водят до увеличаване на тока в БЕС, като за последното увеличението на електрическите показатели е над пет пъти.

10. Използвана литература

- [1] M. Stoyanova, Електрохимичен елемент (ЕХЕ). Електродвижещо напрежение на галваничния елемент (ЕДН)- възникване и измерване. Термодинамика на галваничния елемент., (n.d.).
- [2] D.R. Lovley, Bug juice: harvesting electricity with microorganisms, *Nat Rev Microbiol* 4 (2006) 497–508. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1442>.
- [3] Potter M.C., Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 84 (1911) 260–276. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1911.0073>.
- [4] H.P. Bennetto, J.L. Stirling, K. Tanaka, C.A. Vega, Anodic reactions in microbial fuel cells, *Biotechnol Bioeng* 25 (1983) 559–568. <https://doi.org/10.1002/BIT.260250219>.
- [5] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology, *Environ Sci Technol* 40 (2006) 5181–5192. <https://doi.org/10.1021/es0605016>.
- [6] A.A. Yaqoob, M.N.M. Ibrahim, C. Guerrero-Barajas, Modern trend of anodes in microbial fuel cells (MFCs): An overview, *Environ Technol Innov* 23 (2021) 101579. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101579>.
- [7] E. Hubenova, Y. Hubenova, Bacteria and eukaryotes as anodic biocatalysts in microbial fuel cells – A comprehensive review, *J Power Sources* 629 (2025) 236002. <https://doi.org/10.1016/J.JPOWSOUR.2024.236002>.

- [8] D.H. Park, J.G. Zeikus, Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation, *Biotechnol Bioeng* 81 (2003) 348–355. <https://doi.org/10.1002/BIT.10501>.
- [9] Y. Hubenova, R. Rashkov, V. Buchvarov, S. Babanova, M. Mitov, Nanomodified NiFe-and NiFeP-carbon felt as anode electrocatalysts in yeast-biofuel cell, *J Mater Sci* 46 (2011) 7074–7081. <https://doi.org/10.1007/S10853-011-5502-Z>.
- [10] Y. V. Hubenova, R.S. Rashkov, V.D. Buchvarov, M.H. Arnaudova, S.M. Babanova, M.Y. Mitov, Improvement of yeast-biofuel cell output by electrode modifications, *Ind Eng Chem Res* 50 (2011) 557–564. <https://doi.org/10.1021/IE1000949>.
- [11] U. Schröder, Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 2619–2629. <https://doi.org/10.1039/B703627M>.
- [12] B.E. Logan, Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells, *Nature Reviews Microbiology* 2009 7:5 7 (2009) 375–381. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2113>.
- [13] C.I. Torres, R. Krajmalnik-Brown, P. Parameswaran, A.K. Marcus, G. Wanger, Y.A. Gorby, B.E. Rittmann, Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential: Phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization, *Environ Sci Technol* 43 (2009) 9519–9524. <https://doi.org/10.1021/ES902165Y>.
- [14] J.F. Miceli, P. Parameswaran, D.W. Kang, R. Krajmalnik-Brown, C.I. Torres, Enrichment and analysis of anode-respiring bacteria from diverse anaerobic inocula, *Environ Sci Technol* 46 (2012) 10349–10355. <https://doi.org/10.1021/ES301902H>.

- [15] Y. Hubenova, M. Mitov, Extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cells: A review, *Bioelectrochemistry* 106 (2015) 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.04.001>.
- [16] Karen Steward, Gram Positive vs Gram Negative, Technology Networks (2019).
- [17] J. Wang, H. Deng, S.S. Wu, Y.C. Deng, L. Liu, C. Han, Y. Bin Jiang, W.H. Zhong, Assessment of abundance and diversity of exoelectrogenic bacteria in soil under different land use types, *Catena* (Amst) 172 (2019) 572–580. <https://doi.org/10.1016/J.CATENA.2018.09.028>.
- [18] Y. Hubenova, E. Hubenova, M. Mitov, Electroactivity of the Gram-positive bacterium *Paenibacillus dendritiformis* MA-72, *Bioelectrochemistry* 136 (2020) 107632. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107632>.
- [19] K.C. Wrighton, J.C. Thrash, R.A. Melnyk, J.P. Bigi, K.G. Byrne-Bailey, J.P. Remis, D. Schichnes, M. Auer, C.J. Chang, J.D. Coates, Evidence for direct electron transfer by a gram-positive bacterium isolated from a microbial fuel cell, *Appl Environ Microbiol* 77 (2011) 7633–7639. <https://doi.org/10.1128/AEM.05365-11>.
- [20] S.H. Light, L. Su, R. Rivera-Lugo, J.A. Cornejo, A. Louie, A.T. Iavarone, C.M. Ajo-Franklin, D.A. Portnoy, A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria, *Nature* 562 (2018) 140–157. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0498-Z>.
- [21] S. Babanova, Y. Hubenova, M. Mitov, Influence of artificial mediators on yeast-based fuel cell performance, *J Biosci Bioeng* 112 (2011) 379–387. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2011.06.008>.

- [22] Y. Hubenova, M. Mitov, Mitochondrial origin of extracellular transferred electrons in yeast-based biofuel cells, *Bioelectrochemistry* 106 (2015) 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.06.005>.
- [23] A. Gürses, M. Açıkyıldız, K. Güneş, M.S. Gürses, Dyes and Pigments: Their Structure and Properties, (2016) 13–29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33892-7_2.
- [24] E. Wagner-Wysiecka, N. Łukasik, J.F. Biernat, E. Luboch, Azo group(s) in selected macrocyclic compounds, *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 90 (2018) 189–257. <https://doi.org/10.1007/s10847-017-0779-4>.
- [25] S. Benkhaya, S. M'rabet, A. El Harfi, Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes., *Heliyon* 6 (2020) e03271. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03271>.
- [26] M. Marinescu, C.V. Popa, M.A. Tănase, A.C. Soare, C. Tablet, D. Bala, L.O. Cinteza, L.M. Dițu, I.C. Gifu, C. Petcu, Synthesis, Characterization, DFT Study and Antifungal Activities of Some Novel 2-(Phenyldiazenyl)phenol Based Azo Dyes, *Materials* 15 (2022) 8162. <https://doi.org/10.3390/ma15228162>.
- [27] (PDF) Synthesis, spectral studies and biological activity of Azo dye Complexes with Some Metallons, (n.d.). https://www.researchgate.net/publication/326734053_Synthesis_spectral_studies_and_biological_activity_of_Azo_dye_Complexes_with_Some_Metallons (accessed June 30, 2025).
- [28] Robert M Christie, *Colour Chemistry*, 2nd edition, The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK, 2015.

- [29] Y. Hubenova, M. Todorova, R. Bakalska, M. Mitov, Photophysical and Electrochemical Properties of Newly Synthesized Stilbazolium Dyes, *ChemElectroChem* 9 (2022). <https://doi.org/10.1002/celec.202200918>.
- [30] E. Hubenova, M. Mitov, Y. Hubenova, Electrochemical performance of *Paenibacillus profundus* YoMME encapsulated in alginate polymer, *Bioelectrochemistry* 150 (2023) 108354. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108354>.
- [31] Yulian Tumbariski, Vyara Lincheva, Nadezhda Petkova, Radosveta Nikolova, Radka Vrancheva, Ivan Ivanov, ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACT FROM AERIAL PARTS OF *POTENTILLA* (*POTENTILLA REPTANS* L.), *INDUSTRIAL TECHNOLOGIES* 4 (2017).
- [32] J.K. Novev, R.G. Compton, Natural convection effects in electrochemical systems, *Curr Opin Electrochem* 7 (2018) 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.09.010>.
- [33] A.J. Cohen, P. Mori-Sánchez, W. Yang, Insights into Current Limitations of Density Functional Theory, *Science* (1979) 321 (2008) 792–794. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1158722>.
- [34] E. Kim, S.H. Lee, S.J. Lee, O.P. Kwon, H. Yoon, New antibacterial-core structures based on styryl quinolinium, *Food Sci Biotechnol* 26 (2017) 521–529. <https://doi.org/10.1007/S10068-017-0072-8/METRICS>.
- [35] D.R. Lovley, Electrically conductive pili: Biological function and potential applications in electronics, *Curr Opin Electrochem* 4 (2017) 190–198. <https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2017.08.015>.

Приложение 1

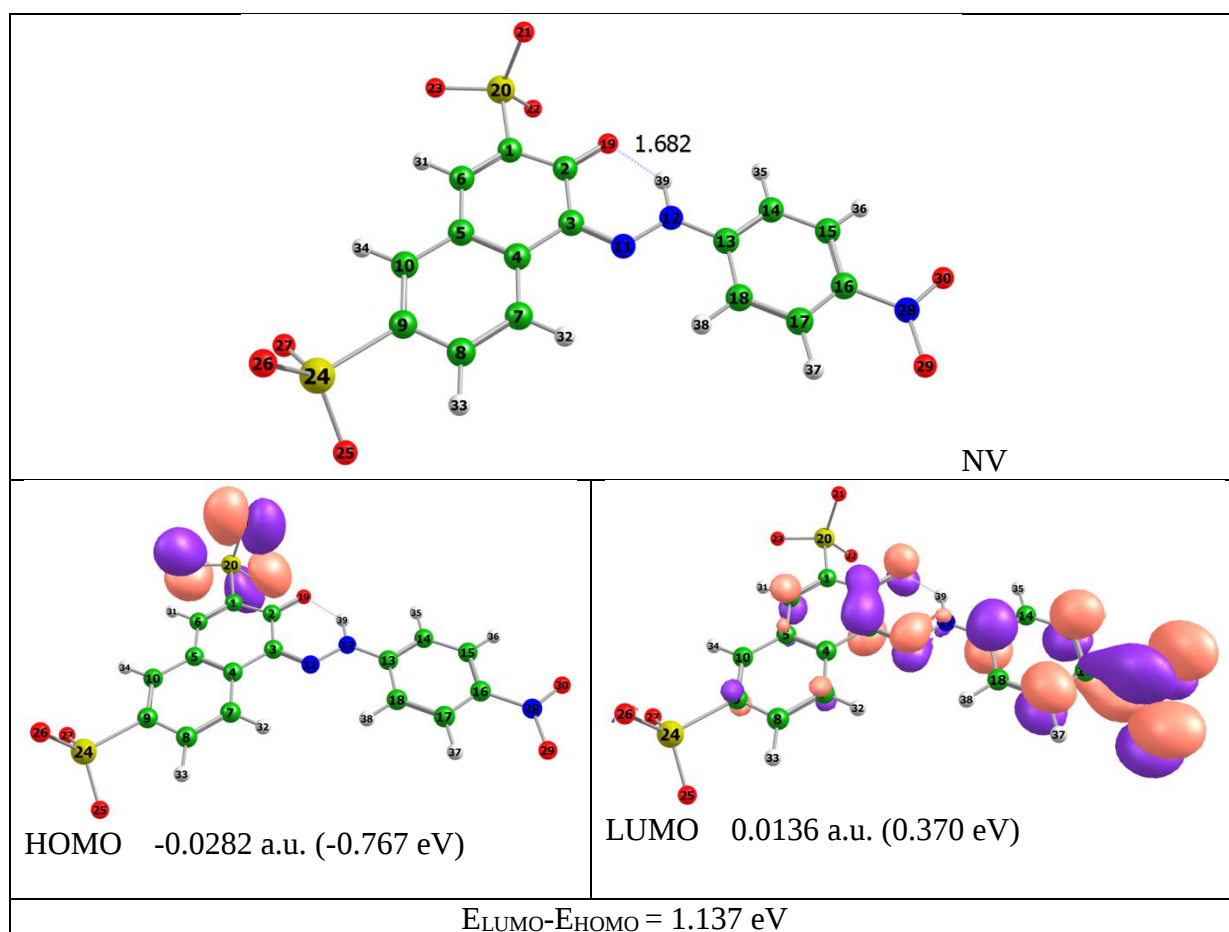
Изчисление на HOMO/LUMO енергийни нива на база проведени DPV.

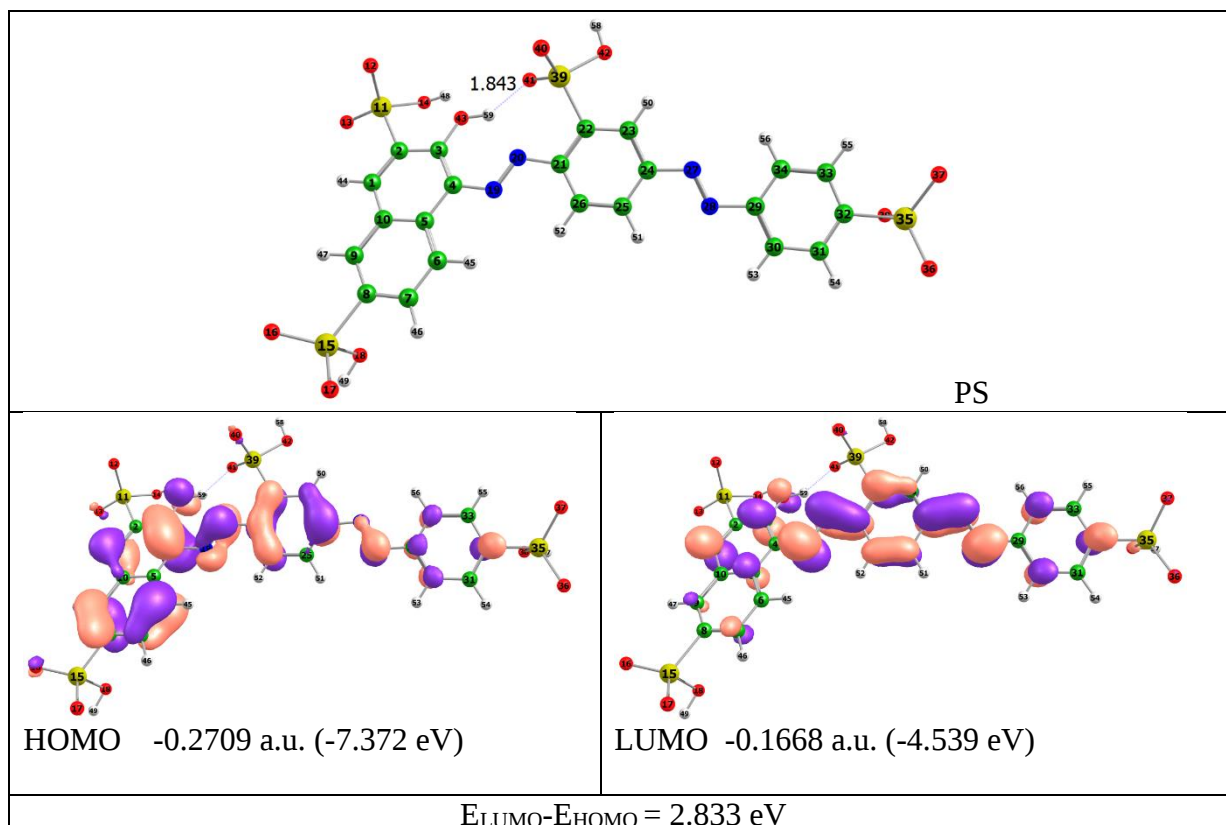
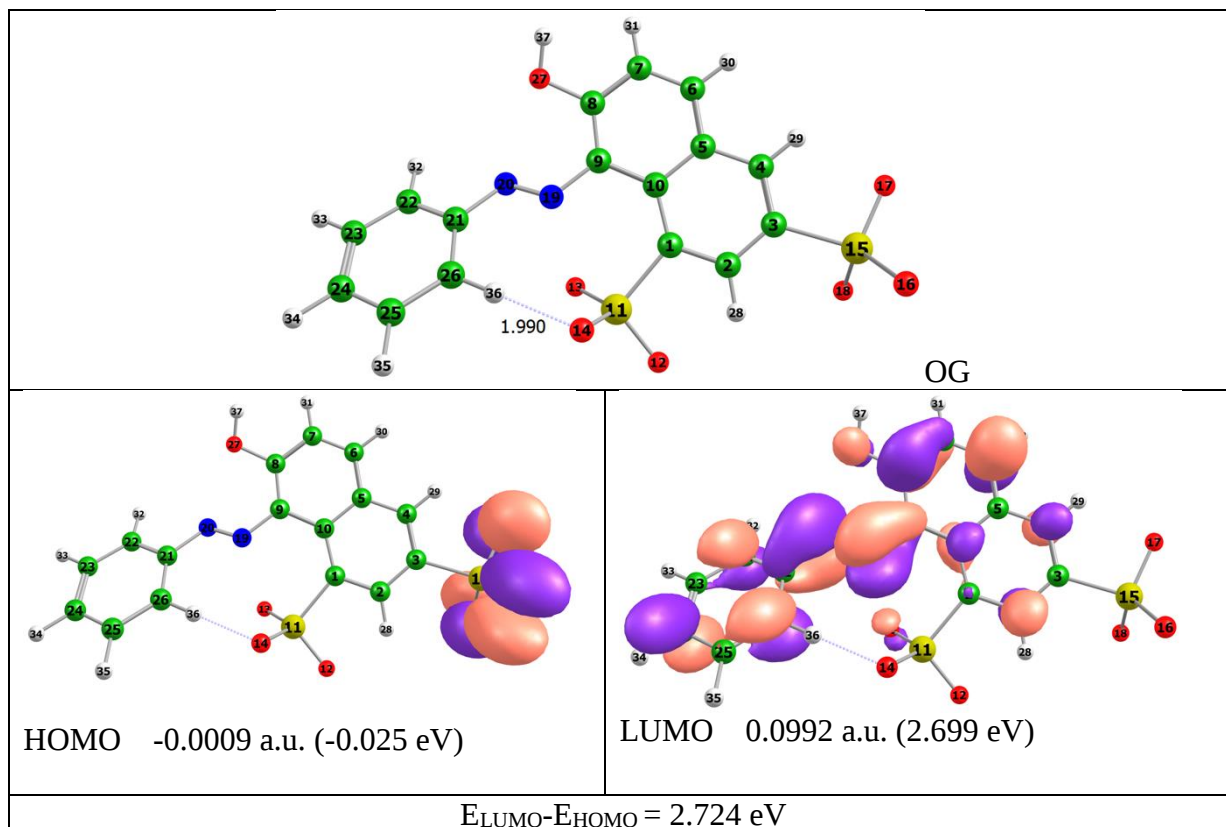
	Abs.									by DPV		
Dye	$E_g^{opt} = 1240/\lambda_{abs}^{onset}$		$\hat{E}_g^{opt}$	SD	λ_{abs}^{onset} , nm	λ_{abs}^{onset} , nm	λ_{abs}^{onset} average	SD	λ_{max} , nm	E_{ox}^{onset} DPV vs SHE	HOMO = $-(E_{ox}^{onset} + 4.44)$ eV	LUMO = HOMO + $E_g^{opt} = 1240/\lambda_{abs}^{onset}$
b-Naphtol Violet	2,238	2,208	2,223	0,015	554	569	561,50	7,50	490	-0,588	-3,852	-1,614
Orange G	2,335	2,326	2,331	0,004	531	535	533,00	2,00	477	-0,533	-3,907	-1,572
Ponceau S	2,120	2,114	2,117	0,003	585	588	586,50	1,50	514	-0,845	-3,595	-1,475
Orange II	2,234	2,255	2,244	0,010	555	545	550,00	5,00	484	-0,524	-3,916	-1,682
Methyl orange	2,255	2,255	2,255	0,000	550	550	550,00	0,00	465	-0,476	-3,964	-1,709
Congo red	2,095	2,093	2,094	0,001	592	593	592,50	0,50	487	-0,466	-3,974	-1,879

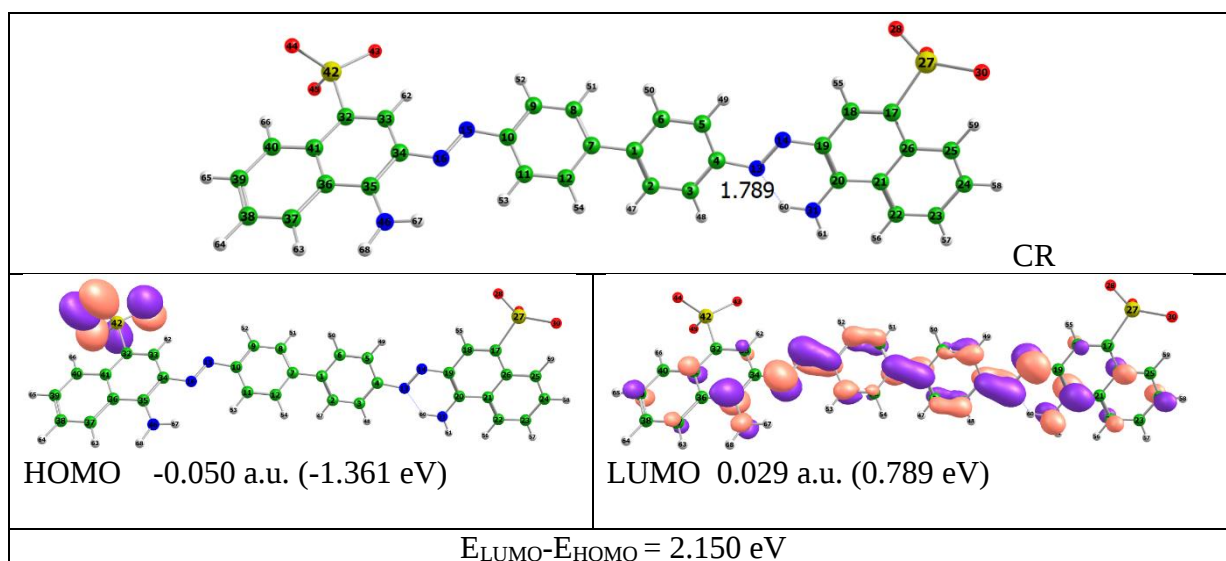
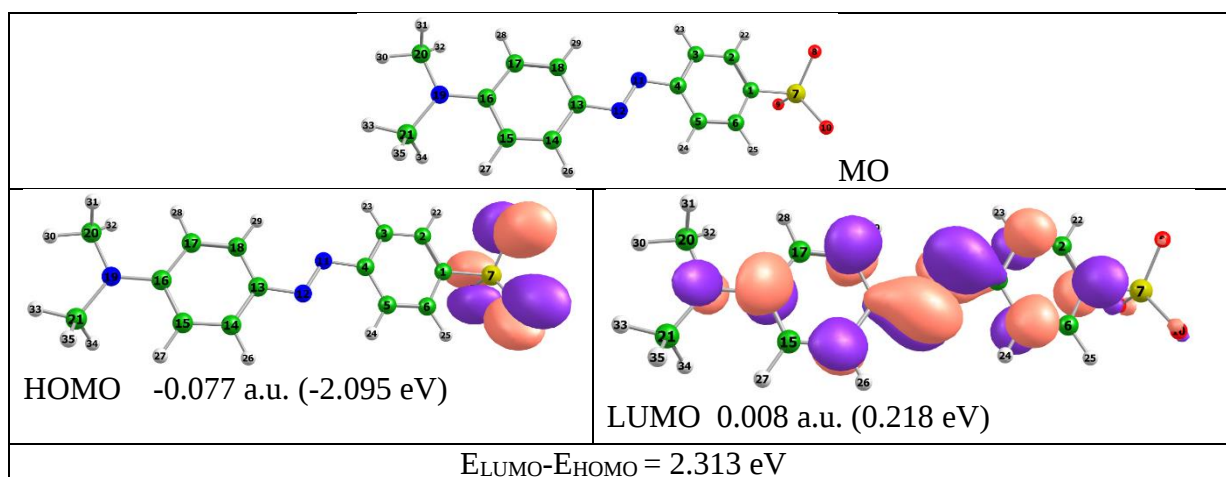
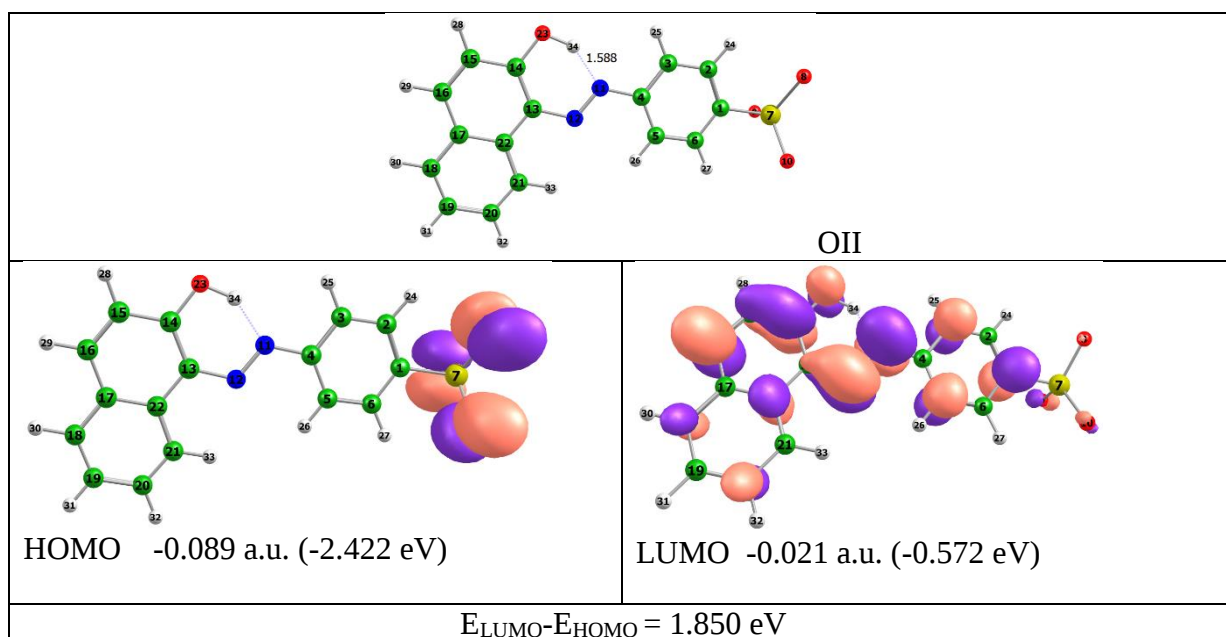
Приложение 2

Модели на багрилата в изолирано състояние, съответстващо на условия на вакуум или газова фаза.

Представени са структурите и граничните молекулни орбитали на изследваните багрила, получени чрез метода B3LYP/6-31G в газова фаза (вакуум). Представени са енергийните нива на граничните орбитали и енергийната празнина (ELUMO-EHOMO). Тъй като са изключени взаимодействията с разтворител няма нито диелектрична константа, нито ефект на поляризация.







Анализът на електронната структура показва, че преносът на заряд в молекулата се осъществява от ароматната азо-система към сулфогрупата. Това е в съответствие със силните електрон-приемащи (акцепторни) свойства на сулфозаместителя, проявяващ както мезомерен (-M), така и индукционен (-I) ефект. В резултат на тези ефекти се наблюдава намаляване на електронната плътност върху бензеновия пръстен и дезактивиране на неговата π -система. При PS багрилото основният електронен преход $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$ представлява чист $\pi \rightarrow \pi^*$ преход, характерен за такива делокализирани ароматни системи. Именно този преход е отговорен за главния максимум на абсорбция в UV спектъра на съединението.

Участия и изнесени доклади и научни съобщения на национални и международни форуми

1. Yolina Hubenova, **Eleonora Hubenova**, Mina Todorova: Electrochemistry of Dyes in Nonconductive Medium. 39th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry, Natal, Brasil 23.03. -26.03. 2025 (Poster), <https://topical39.ise-online.org/>
2. **Eleonora Hubenova**, Mina Todorova, Yolina Hubenova. Azo Dyes As Electrochemically Active Molecules For Use As Exogenous Mediators In MFC. 39th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry, Natal, Brasil 23.03. - 26.03. 2025 (Poster), <https://topical39.ise-online.org/>
3. **Eleonora Hubenova**, Mina Todorova, Romyana Bakalska, Yolina Hubenova. Електрохимична активност на азо багрила. 7-та Научна конференция за студенти, докторанти и млади учени „Предизвикателства в Химията”, 18.-19.10.2024 Пловдив (доклад), <https://scc.uni-plovdiv.net/>
4. Yolina Hubenova, Mina Todorova, **Eleonora Hubenova**, Romyana Bakalska, Mario Mitov. HOMO/LUMO energy levels of the azo-dyes Ponceau S, β -Naphthol violet, and Orange G. Sofia Electrochemical Days 2024, July 2-6, Varna Bulgaria (доклад).
<https://sed.iees.bas.bg/bg/about-179>
5. **Eleonora Hubenova**, Mina Todorova, Mario Mitov, Romyana Bakalska, Yolina Hubenova, A redox activity of the diazo dye acting as an exogenous mediator of electron transfer. 9th Regional Symposium on Electrochemistry -South-East Europe (RSE-SEE 9), Novi Sad, Serbia, 03.06 to 07.06. 2024 (Poster), <https://aseee.eu/index.php/rse-see-9-home>
6. **Eleonora Hubenova**, Mina Todorova, Mario Mitov, Romyana Bakalska, Yolina Hubenova, Determination of the highest and lowest unoccupied molecular orbital energy levels of the azo dyes β -naphthol violet and orange G, 8th International Conference on Bio-Sensing Technology, 12th to 15th May, 2024, Melia Sevilla, Spain (Poster),
<https://www.elsevier.com/events/conferences/all/international-conference-on-bio-sensing-technology>