

УДК 579.66, 579.222.4

ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ФИОЛЕТОВОГО СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРОЙ В УСЛОВИЯХ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

© 2024 г. А. А. Самков^{1, *}, Е. В. Панкратова^{1, 2}, М. Н. Круглова¹, А. В. Беспалов¹, С. М. Самкова¹, Н. Н. Волченко¹, А. А. Худокормов¹

¹Кубанский государственный университет, Краснодар, 350040 Россия

²Научно-технологический университет “Сириус”, Краснодарский край, 354340 Россия

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2023 г.

После доработки 23.11.2023 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

В донных отложениях пресных водоемов обнаружено варьирование относительной представленности копий бактериальных генов пероксидаз ДуР, обесцвечивающих красители, характерных для рода *Shewanella* и ряда других микроорганизмов. Показано, что скорость обесцвечивания кристаллического фиолетового в лабораторной мембранной биоэлектрохимической системе смешанной культурой донных отложений, показавшей наибольшую представленность генов ДуР, зависела от способа электрической стимуляции внешней цепи и концентрации красителя. После повышения концентрации выше 20 мкМ максимальная скорость обесцвечивания достигалась при наличии полярно подключенного ко внешней электрической цепи биоэлектрохимической системы ионистора и составила 3.23 ± 0.11 мкМ/ч, в то время как при противоположном по полярности подключении наблюдалось минимальное значение 2.07 ± 0.08 мкМ/ч. В случае разомкнутой цепи и резистора имели место сходные показатели – 2.88 ± 0.09 и 2.67 ± 0.12 мкМ/ч соответственно. При анализе продуктов обесцвечивания отмечено согласованное снижение максимумов полос поглощения красителя, свидетельствующее о более полной его деградации смешанной культурой. Результаты могут представлять интерес для повышения эффективности биоэлектрохимических методов экологической биотехнологии, путем электростимуляции внешней цепи.

Ключевые слова: биоэлектрохимическая система, обесцвечивающие красители пероксидазы ДуР, кристаллический фиолетовый, трифенилметановый краситель, биоэлектрокатализ, обесцвечивание, микробный топливный элемент

DOI: 10.31857/S0555109924030075 EDN: EWOKYE

Поступательное развитие форм использования биоэлектрохимических систем, исходно связанных с микробными топливными элементами [1], обеспечивавшими получение электроэнергии, в настоящее время привело к широкому использованию таких систем в экологической биотехнологии [2–6], биосенсорах [7–11], биоэлектрокатализе [12, 13], биоэлектросинтезе [14] и др.

Изменение качественных и количественных характеристик микробиоценоза, функционирующего в условиях биоэлектрохимической системы, действующей в условиях пассивной поляризации, связано с размещением электродов в средах с разными значениями окислительно-восстановительного потенциала. При этом в зоне размещения анода, где окислительно-восстановительный потенциал низок, микрофлора вблизи поверхности электрода имеет преимущество за счет возможности сброса

избыточных восстановительных эквивалентов на искусственный акцептор электронов – анод. Это решает проблему недостатка конечных акцепторов электронов при катаболизме органических субстратов. При этом формирование сообществ, включающих, на конечных этапах, передачу электронов на анод, увеличивает интенсивность утилизации органического субстрата в анаэробных условиях [15]. Другим механизмом стимуляции является “электрическая синтрофия”, заключающаяся в облегчении прямого транспорта электронов между членами синтрофных сообществ, что выражается, например, в усилении метаногенеза, при наличии в анаэробной среде электропроводящих материалов [16].

Наиболее эффективными экзоэлектрогенными микроорганизмами являются способные использовать внешние неорганические акцепторы

электронов сапрофиты, например, *Shewanella oneidensis* [17]. Роль подобных микроорганизмов в микробиоценозах биоэлектрохимических систем может быть связана с конечным звеном цепей межвидового переноса электронов — “биоэлектрохимических трубопроводов”, решающих, в том числе, проблему недостатка акцепторов в восстановительных условиях [16, 18].

Использование внешней стимуляции электрической цепи биоэлектрохимической системы значительно расширяет возможности воздействия на катаболические процессы, происходящие в околоанодной зоне, по сравнению с условиями естественной поляризации, где разность потенциалов между электродами исходно ограничена естественным максимумом около одного вольта [19]. В работе [20] доказано, что при приложении слабого внешнего напряжения (0.1–0.3 В) к электродам, находящимся в среде с культурой псевдомонад, в условиях аэрации, происходило изменение скорости деградации фенантрена, что было объяснено, в том числе, изменением проницаемости мембран, ростом относительной экспрессии (к гену *16s* рРНК) ключевых генов деградации данного субстрата у *Pseudomonas* — *nahAc*, *pcaH* и *xylE*. Для выяснения кинетики деструкционных процессов, осуществляемых уже в анаэробных условиях в классической биоэлектрохимической системе, где электроды размещены в зоны с разными знаками окислительно-восстановительного потенциала, соединенные протонообменной системой, ранее были проведены исследования кинетики обесцвечивания чистой культурой *S. oneidensis* MR-1 азокрасителя и трифенилметанового красителя в условиях анодной камеры биоэлектрохимической системы мембранного типа [21]. Впервые было использовано прямое и обратное по полярности подключение внешнего источника тока и напряжения, обнаружившее влияние этого фактора, при исходном равенстве прикладываемых разностей потенциалов, на кинетику процесса и спектр конечных продуктов распада кристаллического фиолетового.

Кристаллический фиолетовый, как и другие анилиновые красители, широко используется в различных технологиях и процессах, что определяет его попадание во внешнюю среду при синтезе и использовании в различных производствах. В связи с этим, ряд исследований посвящен проблеме биodeградации красителя во внешней среде [22, 23]. Помимо роли данного красителя как загрязнителя окружающей среды, он удобен для использования в качестве модельного объекта изучения влияния биоэлектрохимической деградации в условиях анодной камеры, так как имеет стабильный спектр поглощения в широком диапазоне pH и редокс-устойчив [21]. Исследование обесцвечивания смешанной культурой в условиях электростимуляции необходимы для сравнения

с результатами, полученными на чистой культуре *S. oneidensis* MR-1 в аналогичных экспериментальных условиях, так как смешанные микробиоценозы донных отложений за счет прямой передачи электронов и протонов между клетками различных видов и электродами могут показать иную зависимость. Кроме того, в условиях практического использования, например в анаэробных очистных сооружениях, биodeградация осуществляется именно смешанными культурами.

Известно, что при внесении в анодную зону биоэлектрохимической системы редокс-устойчивых красителей наблюдается их обесцвечивание в результате воздействия бактериальных ферментов класса пероксидаз [24], имеющих у представителей рода *Shewanella* и многих других таксонов бактерий. Способность представителей *Shewanella* обесцвечивать красители связана, в частности, с системами пероксидаз класса DyP или краситель-обесцвечивающих пероксидаз (dye decolorizing peroxidases) [25–27]. Такие пероксидазы широко представлены, в частности, у протеобактерий и актинобактерий [28].

Ранее в работе [21] было сделано предположение, что общеизвестная значительная экзоэлектрогенная активность *S. oneidensis* MR-1 в условиях внешней стимуляции электрической цепи биоэлектрохимической системы, обеспечивала сопряжение работы ферментов, ответственных за обесцвечивание, и электрохимических процессов, проходящих на поверхности анода. Экстраполяция обнаруженных на чистой культуре эффектов на естественные микробиоценозы требует проверки при воздействии на краситель смешанной культурой, присутствующей в донных отложениях — повсеместно распространенной природной среды с восстановительными условиями, где накапливаются и сохраняются многие поллютанты. Подобные среды, в естественных условиях включающие как электроактивные микроорганизмы, так и микроорганизмы-деструкторы представляют собой значительно более сложную систему, реагирующую на электрохимическую стимуляцию изменением скорости разложения поллютантов [29]. При этом, межвидовой перенос электронов, показанный в работе [18], демонстрирует рост показателей деструкции, а также теоретическую возможность смешанных культур донных отложений и подобных сред формировать, в условиях биоэлектрохимической стимуляции, альтернативные трофические цепи и/или синтрофные связи, отличающиеся от типовых в анаэробных процессах [17]. Учет относительной представленности генов пероксидаз класса DyP в тотальной ДНК, выделенной из смешанных культур донных отложений разных водоемов, в том числе, использованных в качестве источника микрофлоры в настоящих экспериментах, может указывать на возможную взаимосвязь механизма

сопряжения электростимуляции и обесцвечивания красителя на уровне ферментных систем.

Цель данной работы — экспериментально проверить эффект воздействия внешней электрической стимуляции, на скорость обесцвечивания трифенилметанового красителя смешанной культурой донных отложений в условиях анодной камеры микробного топливного элемента.

МЕТОДИКА

Биоэлектрохимические системы представляли собой микробные топливные элементы (МТЭ) мембранного воздушно-катодного типа с объемом анодной камеры 69 мл с катионообменной мембраной МФ-4СК (ОАО “Пластополимер”, Россия) размером 35×35 мм, выполнявшей функцию протонообменной системы [30]. Электроды были выполнены из углеродного войлока НТМ-200М (АО “НИИЭИ”, Россия) толщиной 4 мм, анод имел размер 20×50 мм, воздушный катод был выполнен в форме диска диаметром 18 мм, непрерывно капиллярно смачиваемого дистиллированной водой и прижатого к мембране МФ-4СК. Электроды контактировали со внешней цепью через графитовые стержни для разобщения металлических проводников внешней цепи и жидкой среды. В случае анода графитовый стержень диаметром 2.0 мм проходил через резиновую крышку анодной камеры, обеспечивающую герметичность и далее сквозь находящийся под крышкой прямоугольник из войлока вдоль его длинной оси. Войлок был прижат к стержню хомутом-стяжкой и закреплен на пластиковом сетчатом каркасе, прикрепленном к стенкам анодной камеры. Находящийся на воздухе и прижатый к мембране МФ-4СК катод контактировал с графитовым стержнем через прижатую к нему полоску углеродного войлока, один конец которой был погружен в емкость с дистиллированной с водой для смачивания катода. Перед использованием мембраны переводили в протонную форму по стандартной методике окислительно-термического кондиционирования перфторированных мембран [31].

В качестве среды анодной камеры использовали искусственную сточную воду следующего минерального состава (мг/л): NaHCO_3 — 480; NH_4Cl — 95.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 146.7; KH_2PO_4 — 52.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 63.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 19.2 [32]. В качестве источника углерода и энергии использовали пептон — 1.0 г/л.

Для инокуляции среды использовали микрофлору донных отложений озера Карасунское (Краснодар, Россия), отобранных в прибрежной зоне на глубине около 0.3 м из горизонта 3–7 см от поверхности ила. Исходный титр был установлен посевом разведений в полужидкий

питательный агар (ПЖА), следующего состава (г/л): ГМФ-бульон — 30, глюкоза — 10, агар-агар — 10. После автоклавирования при 0.5 атм в течение 20 мин в стерильные пробирки вносили 1 мл. свежеприготовленного разведения исследуемого образца в физрастворе и 10 мл остуженного до $45\text{--}48^\circ\text{C}$ ПЖА. Содержимое быстро перемешивали вращательными движениями, сверху наливали 0.5 мл вазелинового масла и инкубировали при 25°C 7–10 сут. Титр общей гетеротрофной микрофлоры в донных отложениях составлял около 8×10^9 КОЕ/мл. Донные отложения разбавляли до конечного титра в анодной камере около 10^7 кл./мл.

Инкубирование биоэлектрохимических систем проводили при 25°C на орбитальных качалках Multi Shaker Psu 20i (“Biosan”, Латвия) на 100 об./мин, для предотвращения осаждения клеток на дне анодной камеры и выравнивания условий в объеме. О достижении анаэробноз судили по нарастанию разности потенциалов между анодом и катодом в биоэлектрохимической системе в режиме разомкнутой цепи, до внесения красителя. Контроль осуществляли при помощи измеряющего окислительно-восстановительный потенциал электрода HI3230 прибора Hanna HI8424 (“Hanna Instruments”, Германия). Для приложения внешней разницы потенциалов использовали ионисторы Maxwell BCAP0350 E270 T11 (“Maxwell”, Китай) с низким током саморазряда — не более 0.3 мА.

Для осаждения клеток перед измерением оптической плотности применяли центрифугу PC-6МЦ (“Dastan” Киргизия).

Для оценки концентрации красителя измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре Leki SS2107 (“LEKI Instruments”, Финляндия) в спектрофотометрических кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм при длине волны 590 нм. Регистрацию оптических спектров поглощения среды (диапазон $\lambda = 190\text{--}1100$ нм) проводили на том же спектрофотометре Leki SS2107 UV в кварцевых кюветах с использованием программного обеспечения Leki ScanPro.

Измерение разности потенциалов проводили при помощи прецизионного цифрового мультиметра Актаком АММ-1139 (ЗАО НПП “Эликс”, Россия).

Для выделения ДНК из донных отложений использовали набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из образцов, содержащих гуминовые кислоты “МетаГен” EW-002 (ООО “НПФ Синтол”, Россия). Ручную пробоподготовку проводили в соответствии с рекомендациями производителя с использованием жидкого азота.

Концентрацию ДНК измеряли с помощью фотометра Implen Nano Photometer N60 (“Implen”, Германия) в объеме 2 мкл.

Для амплификации на Rotor-Gene Q (“QIAGEN GmbH”, Германия) использовали набор реагентов R-402 для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (ООО “НПФ Синтол”, Россия). Использовали универсальные праймеры к гену 16S рРНК (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и 805R5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'), а также вырожденные праймеры для широкого круга бактериальных обесцвечивающих красители пероксидаз DyP, (F 5'-GAYCTGTGCTTYGARCTSGC-3', R5'-ASCCGATRAARTASGTGCC-3') [33]. Относительную представленность генов пероксидаз вычисляли как отношение предварительно выявленной эффективности ПЦР с праймерами для 16S рРНК к таковой для DyP, в степенях соответствующих значений циклов количественной оценки Cq для референсного и целевого генов [34, 35]. Для построения кривой зависимости Cq от десятичного логарифма концентрации ДНК-матрицы и определения эффективности ПЦР с праймерами для генов 16S рРНК и DyP, в качестве контроля использовали ДНК, выделенную из культуры *S. oneidensis* MR-1.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверным считали различие при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что механизм обесцвечивания кристаллического фиолетового многими микроорганизмами связан с обесцвечивающими краситель пероксидазами [35]. В частности, способная обесцвечивать краситель культура *S. oneidensis* MR-1 имела в хромосоме ген пероксидазы (DyP) обесцвечивающей краситель, что можно видеть в геномных сборках базы NCBI, например, AE014299.2 в положении 756464–757399 нуклеотидов, CP053946.1 в положении 1347631–1348566 и др. [36]. Для непосредственного выявления

гомологов генов DyP у широкого круга микроорганизмов разных филумов, в том числе, у различных протеобактерий, представленных в донных отложениях, в настоящее время эффективно используются вырожденные праймеры [33]. Ранее, при помощи данных праймеров, наличие этого гена было проверено на имеющейся культуре *S. oneidensis* MR-1 методом классической ПЦР [21].

Для оценки связи ключевых ферментативных механизмов, участвующих в обесцвечивании кристаллического фиолетового чистой культурой *S. oneidensis* MR-1 и смешанными культурами донных отложений различных водоемов Краснодарского края, методом рвПЦР оценивали относительную представленность копий гомологов генов DyP в тотальной ДНК, выделенной из образцов. Для получения стандартных кривых и определения эффективности ПЦР-реакции проводили с серией десятикратных разбавлений ДНК, выделенной из клеточной биомассы *S. oneidensis* MR-1. В качестве праймеров использовали вырожденные для DyP, а также праймеры для гена 16S рРНК, использованного в качестве гена домашнего хозяйства. Эффективность ПЦР при использованных параметрах реакции составила 1.87 и 1.99 для DyP и 16S рРНК соответственно. Тотальную ДНК, выделенную из образцов донных отложений разных водоемов, использовали в качестве матрицы в сериях амплификаций с праймерами к указанным генам. Относительную представленность выражали как отношение эффективностей ПЦР для референсного гена 16S рРНК к целевому, в степенях соответствующих циклов количественной оценки. Было обнаружено, что гены гомологов DyP представлены в микрофлоре всех образцов донных отложений, значительно варьируя по относительному количеству (рис. 1).

Обнаруженная значительная представленность гомологов генов DyP в ДНК из донных отложений согласуется с современными представлениями о большой распространенности подобных

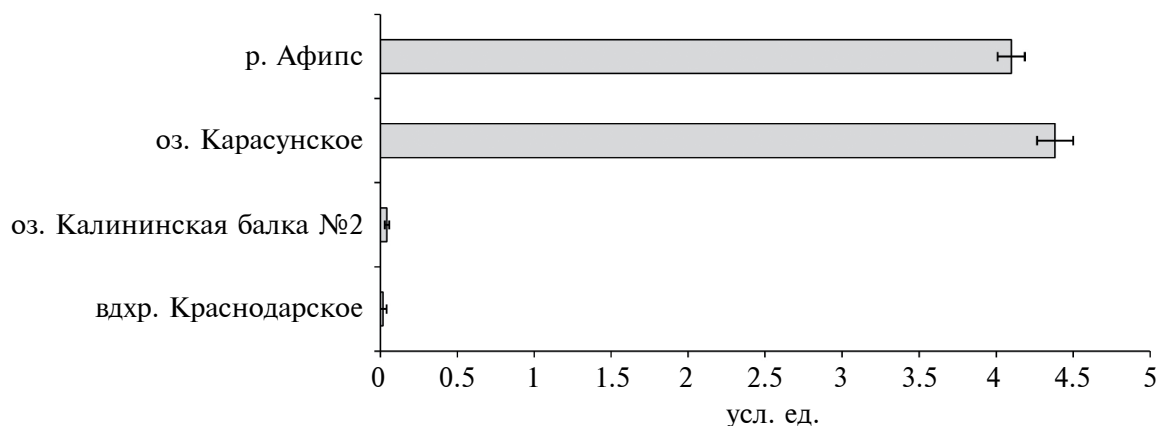


Рис. 1. Относительная представленность генов DyP в образцах донных отложений пресных водоемов Краснодарского края.

пероксидаз среди представителей различных таксонов [37] и демонстрирует наличие микроорганизмов-носителей данного гена в смешанной культуре донных отложений, предложенной для обесцвечивания в исследуемой биоэлектрохимической системе трифенилметанового красителя. Для дальнейшей работы, в качестве биологического агента, обесцвечивающего кристаллический фиолетовый в условиях биоэлектрохимической стимуляции, был выбран образец с наибольшим значением относительной представленности генов *DyP*, а именно образец из оз. Карасунское (Краснодар, Россия).

После выдерживания биоэлектрохимических систем, инокулированных смешанной культурой донных отложений в течение суток, для выравнивания разности потенциалов, в анодные камеры вносили кристаллический фиолетовый, до конечной концентрации 6.13 мкМ, а к электродам подключали один из вариантов внешних электрических цепей: пассивное сопротивление (резистор 1 кОм), либо заряженный до напряжения 1.2 В, ионистор с прямой полярностью подключения (отрицательный полюс подключен к аноду биоэлектрохимической системы), либо аналогичный ионистор с обратной полярностью подключения (положительный полюс к аноду). При отсутствии резистора или ионистора цепь была разомкнутой.

Данные варианты внешней электрической цепи представляли собой наиболее простую совокупность вариантов естественной и искусственной поляризации электродов в близких пределах значений разности потенциалов. Варианты “разомкнутая цепь” и “резистор 1 кОм” являются самыми распространенными в работах с биоэлектрохимическими системами. Вариант “разомкнутая цепь” исключает контакт анода с катодом, и следовательно, возможность вывода электронов через внешнюю цепь. При этом электропроводящий углеродный войлок анода сохраняет возможность стимулировать обесцвечивание красителя несколькими способами: через использование развитой поверхности для формирования микробных биопленок и концентрирования там кристаллического фиолетового, либо, за счет электропроводности материала, через усиление передачи электронов между микроорганизмами [16]. В случае варианта “резистор 1 кОм” между анодом и катодом обеспечивается протекание электрического тока. Величина сопротивления 1 кОм является наиболее универсальной при исследовании биоэлектрохимических систем, так как близка к порядку величин их внутреннего сопротивления. Разность потенциалов 1.2 В, используемая в вариантах “ионистор “+”” и “ионистор “-”” связана с максимальным теоретическим значением напряжения в микробных топливных

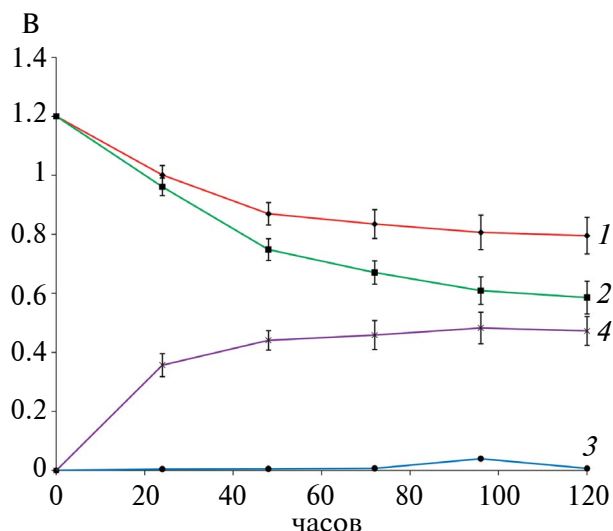


Рис. 2. Динамика разности потенциалов между электродами биоэлектрохимических систем в ходе обесцвечивания кристаллического фиолетового смешанной культурой донных отложений в зависимости от электрической стимуляции внешней цепи. 1 — ионистор прямой полярности подключения, 2 — ионистор обратной полярности подключения (значения приведены по модулю), 3 — резистор 1 кОм, 4 — разомкнутая цепь.

элементах, равным 1.105 В [19]. Было предположено, что полярное подключение ионистора (положительный электрод к катоду, отрицательный к аноду, вариант “ионистор “+””) и противоположное (“ионистор “-””) дадут противоположные эффекты воздействия на процесс разложения кристаллического фиолетового, усиливая или ослабляя сопряжение анодных полуреакций с биодеградацией красителя клетками.

Культивирование велось на движущейся платформе орбитального шейкера, при температуре 25°C и 100 RPM, с фиксацией оптической плотности центрифугата на длине волны 590 нм. Отбор (анодную жидкость) и внесение раствора красителя, во взаимокompенсирующих объемах по 0.5 мл, осуществляли иглой через резиновую крышку анодной камеры, для исключения доступа воздуха. Кратковременные перепады давления в анодной камере компенсировались упругой деформацией эластичной крышки и мембраны. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях.

Через 1 сут инкубации, краситель вносили повторно, каждый раз увеличивая концентрацию на 18.38 мкМ в сут (расчетные концентрации 6.13, 24.51, 42.89 и 61.28 мкМ) и фиксируя оптическую плотность, что позволило оценить зависимость скорости обесцвечивания красителя от его концентрации. Для оценки разряда ионисторов, а также оценки естественной поляризации электродов в вариантах с сопротивлением

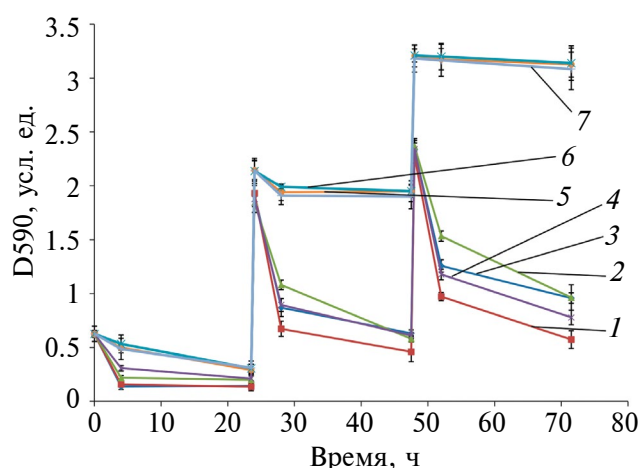


Рис. 3. Динамика D590 раствора кристаллического фиолетового при его ступенчатом внесении, в зависимости от электрической стимуляции внешней цепи. 1 – ионистор прямой полярности подключения, 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 кОм, 4 – разомкнутая цепь, 5 – контроль без инокулята, 6 – ионистор прямой полярности подключения (контроль с автоклавированным инокулятом), 7 – ионистор обратной полярности подключения (контроль с автоклавированным инокулятом).

(“разомкнутая цепь”) и без резистора – то есть с разомкнутой цепью (РЦ) (“разомкнутая цепь”), фиксировали разности потенциалов между катодом и анодом. Для варианта “ионистор “–”” приведены модули значений. Результаты показаны на рис. 2.

Быстрое нарастание разности потенциалов до величин более 0.4 В, отражаемое кривой 4 (разомкнутая цепь), а также наличие электрического тока микроамперного порядка (кривая 3, резистор 1 кОм) на всем протяжении эксперимента говорит об отсутствии токсического действия использованных концентраций красителя на микрофлору. Достигнутое значение 0.48 В близко к значениям напряжения разомкнутой цепи аналогичными биоэлектрохимическим системам без кристаллического фиолетового, составляющим 0.45–0.55 В. Отмечен эффект значительно более интенсивного разряда ионистора, подключенного с обратной полярностью (отрицательным полюсом к катоду), по сравнению с ионистором прямой полярности. Количество электричества, продуцируемого биоэлектрохимическими системами за этот период, вычисляется как произведение величины электрического тока (полученного на основании закона Ома для участка цепи, делением напряжения в варианте “резистор 1 кОм” на сопротивление) на время (ед. кулон). Полученная величина была более чем на порядок ниже

израсходованной ионисторами за это время, вычисленной как разница произведений емкости на напряжение, в конце и начале эксперимента, отдельно для вариантов “ионистор “+”” и “ионистор “–””. Это могло представлять эффект “полупроводника”, связанного с однонаправленным движением протонов через катионселективную мембрану по градиенту концентрации от анаэробной анодной зоны к аэробной катодной.

Динамика оптической плотности кристаллического фиолетового в анодных камерах имела ступенчатый характер, из-за регулярного внесения красителя (рис. 3). По скорости снижения показателя в течение 4 ч после каждого очередного внесения порции субстрата, оценивали скорость реакции. Было обнаружено, что в абиотических условиях снижения ОП₅₉₀ практически не происходило, как при отсутствии внесения инокулята (кривая 5), так и в случае внесения инокулята, подвергнутого автоклавированию (кривые 6 и 7), вне зависимости от электрической стимуляции внешней цепи. Незначительное снижение ОП₅₉₀, отмеченное в течение первых суток после первого внесения кристаллического фиолетового для контроля без инокуляции и контроля с автоклавированным инокулятом могло быть связано с адсорбцией красителя на углеродном войлоке. Войлок имеет значительную удельную поверхность, достигающую тысяч квадратных сантиметров на см³ материала [38] и представляет собой основной сорбент в анодной камере. При инокуляции смешанной культурой донных отложений в конечной концентрации около 10⁷ КОЕ/мл было показано значительное влияние устройства внешней цепи. В частности, более выраженная степень обесцвечивания красителя отмечена при использовании во внешней цепи ионистора, поддерживающего повышенную относительно других вариантов электрической стимуляции разность потенциалов между электродами.

На основании значений ОП₅₉₀ непосредственно перед внесением очередной порции красителя, а также после него, были построены графики зависимости скорости обесцвечивания от концентрации кристаллического фиолетового, для всех вариантов внешней электрической стимуляции (резистор, подключенные прямой и обратной полярностью ионисторы, разомкнутая цепь). Поскольку наибольшая интенсивность обесцвечивания имела место в первые часы после внесения субстрата, диапазон 0–4 ч представлял наибольший интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения, так как проточные системы очистки требуют минимального срока инкубации. Графики зависимости скорости обесцвечивания от концентрации кристаллического фиолетового приведены на рис. 4.

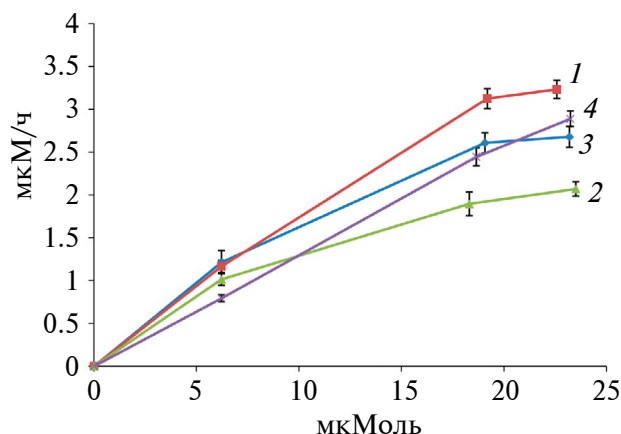


Рис. 4. Зависимость скорости обесцвечивания кристаллического фиолетового в анодных камерах БЭС от электрической стимуляции внешней цепи и концентрации красителя. 1 – ионистор прямой полярности подключения, 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 кОм, 4 – разомкнутая цепь.

Обнаружено, что при использовании смешанной культуры донных отложений, по мере увеличения концентрации субстрата, происходил рост скорости реакции. При этом, подключение внешнего источника тока и разности потенциалов в соответствии с полярностью микробных топливных элементов (ионистор “+”, прямая полярность подключения), обеспечило максимальное значение скорости по сравнению с остальными вариантами и равное 3.23 ± 0.11 мкМ/ч. Показатели в случае “разомкнутой цепи” и “резистора 1 кОм” были сходными и составили 2.88 ± 0.09 и 2.67 ± 0.12 мкМ/ч соответственно. При использовании ионистора с обратной полярностью подключения (ионистор “–”) значение было минимальным в большей части эксперимента и составило в конце эксперимента 2.07 ± 0.08 мкМ/ч. Таким образом, полученные результаты соответствовали таковым при использовании чистой культуры *S. oneidensis* MR-1, где максимальные значения – 2.05 ± 0.07 – 2.91 ± 0.09 мкМ/ч наблюдались для суспендированных и иммобилизованных клеток соответственно при варианте “ионистор “+”” [21]. Однако, были достигнуты более высокие скорости обесцвечивания, что могло быть связано с более высокими катаболическими возможностями смешанной культуры.

Известно, что при электрохимической деградации кристаллического фиолетового в абиотических условиях высокой плотности тока, наблюдалось одновременное снижение интенсивности всех основных пиков поглощения [39]. Широкий набор продуктов обесцвечивания наблюдался при биологической деградации, причем наиболее распространенными путями биологической деградации трифенилметановых красителей были

N-деметилирование и расщепление сопряженной хромофорной структуры [40, 41, 42]. В частности, при биологическом обесцвечивании кристаллического фиолетового чистой культурой *Agrobacterium radiobacter* было отмечено накопление промежуточных продуктов, таких как N,N,N,N-тетраметилпарарозанилин, [N,N-диметиламинофенил] [N-метиламинофенил]бензофенон, N,N-диметиламинобензальдегид, 4-метиламинофенол и фенол [43]. В случае использования лакказы CotA и краситель-обесцвечивающей пероксидазы BaDyP из *Bacillus amyloliquefaciens* в результате N-деметилирования образовывались бис [4-(диметиламино)фенил]метанон и его N-деметилированные производные [22, 44]. В случае представителей рода *Shewanella* наиболее характерными продуктами распада являются N,N-диметиламинобензальдегид и кетон Михлера [23].

Для сравнения состава продуктов распада кристаллического фиолетового, после проведения эксперимента с обесцвечиванием, были проанализированы оптические спектры поглощения содержимого анодных камер, в диапазоне длин волн от 190 до 1100 нм. В качестве образца сравнения использовали дистиллированную воду, среда без добавления красителя в данной области не имела выраженных полос поглощения. Спектральные кривые для всех экспериментальных вариантов в диапазоне 285–800 нм приведены на рис. 5.

Во всех исследуемых образцах по сравнению с контрольным отмечено существенное снижение интенсивности основной полосы поглощения, расположенной в районе 585–590 нм, при этом как форма самой полосы, так и положение максимума ее поглощения оставались практически неизменными. Аналогичную зависимость наблюдали для второго пика, расположенного на 301–304 нм, что позволило сделать предположение о том, что продукты биodeградации смешанной культурой кристаллического фиолетового, в основной своей массе, не обладали поглощением в видимой области спектра. Отсутствие выраженных гипсохромных сдвигов основного пика может свидетельствовать о более глубокой деградации красителя, по сравнению с чистыми культурами, накапливающими соединения с частично разрушенной хромофорной группой, которые поглощали в более коротковолновой части спектра [45]. Обнаружено сходство со спектром поглощения, в данной части спектра, продуктов разложения кристаллического фиолетового пероксидазой BaDyP из *Bacillus amyloliquefaciens*, обесцвечивающей краситель, где отдельные пики продуктов также не были выражены [22].

Таким образом, обнаружено сохранение ранее выявленного на чистой культуре *S. oneidensis* MR-1 эффекта, наблюдавшегося в условиях низкого окислительно-восстановительного потенциала

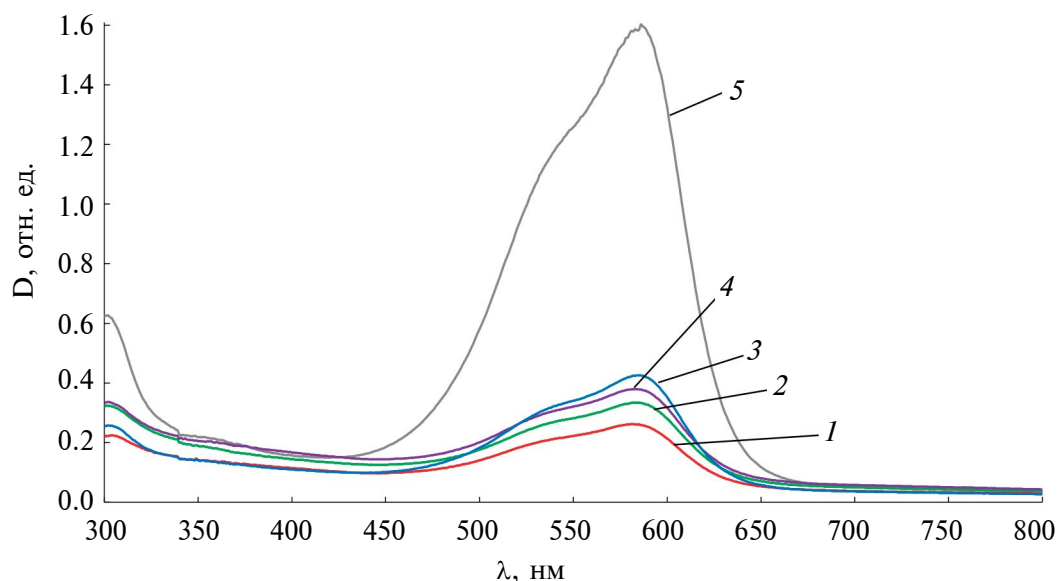


Рис. 5. Спектры поглощения продуктов разложения кристаллического фиолетового смешанной культурой в зависимости от электрической стимуляции внешней цепи. 1 – ионистор прямой полярности подключения. 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 кОм, 4 – разомкнутая цепь, 5 – контроль.

анодной камеры. Эффект сводился к стимуляции обесцвечивания кристаллического фиолетового микробной культурой при подключении внешнего источника тока и напряжения, совпадающего с естественной полярностью биоэлектрохимической системы (БЭС) и ингибированию в случае противоположной полярности. При этом, увеличение скорости реакции по сравнению с чистой культурой могло быть связано с присутствием в смешанной культуре как экзоэлектрогенных микроорганизмов рода *Shewanella*, часто присутствующих в донных отложениях [46], так и иных, обладающих ферментными системами для обесцвечивания трифенилметанового красителя. Это было подтверждено оценкой относительного количества копий генов *DyP* в инокуляте. Сопряжение ключевых реакций обесцвечивания, связанных с N-деметилированием фенильного радикала отщеплением и расщеплением колец, могло осуществляться как в чистой культуре *S. oneidensis* MR-1, через присутствующие в донных отложениях сходные экзоэлектрогенные микроорганизмы. Эти микроорганизмы формируют прямой либо медиаторный обмен электронами с анодом и проявляли себя формированием тока и напряжения в случае разомкнутой цепи и резистора соответственно. Полученные результаты согласуются с описанной в работе [47] зависимостью обесцвечивания азокрасителя смешанной культурой биопленок от тока во внешней цепи. Это указывает на возможность использования биоэлектрохимической стимуляции в смешанных культурах, в природных анаэробных микробиоценозах, формирующих механизмы межвидового переноса

восстановительных эквивалентов [18]. Описанное в работе [48] вовлечение шеванеллами ФМН-зависимых НАДН-азоредуктаз и НАД(Ф)Н-флавинредуктаз в обесцвечивании азокрасителя реактивный черный 5, с учетом роли рибофлавина во внеклеточном переносе электронов у данной группы, показывает разнообразие возможных путей сопряжения экзоэлектрогенеза и биodeградации.

Недавно описанная в статье [49] возможность использования представителями *Shewanella* медиаторов на основе феназинов, синтезируемых псевдомонадами, для двунаправленного переноса заряда через системы цитохромов Mtr/Oms (исходно предполагавшиеся как часть механизма исключительно внеклеточного переноса) демонстрирует одно из возможных объяснений разнонаправленного эффекта воздействия приложенной разности потенциалов разных знаков.

Сохранение влияния на обесцвечивание трифенилметанового красителя кристаллического фиолетового смешанной культурой донных отложений в условиях низкого окислительно-восстановительного потенциала анаэробной анодной камеры БЭС посредством изменения полярности подключения к электродам внешнего источника тока и напряжения, демонстрирует возможность использования подобного подхода в условиях внешней среды. Изменение скорости обесцвечивания от 2.07 до 3.23 мкМ/ч путем подключения ионистора в прямой или противоположной естественному значению полярности биоэлектрохимической системы, показывает не только сохранение эффекта в случае смешанной микробной культуры, но и его усиление

по сравнению с чистой культурой *S. oneidensis* MR-1. Это может быть связано с более широкими катаболическими возможностями природного микробного сообщества, обладающего широкими возможностями сопряжения деградации ксенобиотика с электрохимическими процессами на подвергаемых внешней электрической стимуляции электродах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00401, <https://rscf.ru/project/22-24-00401/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Logan B.E., Regan J.M. // TRENDS Microbiol. 2006. V. 14. № 12. P. 512–518.
2. Lan J., Wen F., Ren Y., Liu G., Jiang Y., Wang Z., Zhu X. // Environ. Sci. Technol. 2023. V. 16. P. 100278. <https://doi.org/10.1016/j.eset.2023.100278>
3. Mohanakrishna G., Al-Raoush R.I., Abu-Reesh I.M. // Biotechnol. Rep. 2020. V. 27. P. e00478. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00478>
4. Wang H., Xing L., Zhang H., Gui C., Jin S., Lin H., Li Q., Cheng C. // Chem. Eng. J. 2021. V. 419. P. 129600. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129600>
5. Kondaveeti S., Govindarajan D., Mohanakrishna G., Thatikayala D., Abu-Reesh I.M., Min B. et al. // Fuel. 2023. V. 331. P. 125632. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125632>
6. Cabrera J., Irfan M., Dai Y., Zhang P., Zong Y., Liu X. // Chemosphere. 2021. V. 285. P. 131428. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131428>
7. Tanikkul P., Pisutpaisal N. // Int. J. Hydrog. Energy. 2018. V. 43. № 1. P. 483–489.
8. Corbella C., Hartl M., Fernandez-Gatell M., Puigagut J. // Sci. Total Environ. 2019. V. 660. P. 218–226.
9. Do M.H., Ngo H.H., Guo W., Chang S.W., Nguyen D.D., Sharma P., et al. // Sci. Total Environ. 2021. V. 795. P. 148755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148755>
10. Guo F., Liu Y., Liu H. // Sci. Total Environ. 2021. V. 753. P. 142244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142244>
11. Askari A., Vahabzadeh F., Mardanpour M.M. // J. Clean. Prod. 2021. V. 294. P. 126349. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126349>
12. Gao Y., Cai T., Yin J., Li H., Liu X., Lu X., et al. // Bioresour. Technol. 2023. V. 376. P. 128835. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128835>
13. Karyakin A.A. // Bioelectrochemistry. 2012. V. 88. P. 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128835>
14. Patil S.A., Gildemyn S., Pant D., Zengler K., Logan B.E., Rabaey K. // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. № 6. P. 736–744.
15. Kiely P.D., Regan J.M., Logan B.E. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 3. P. 378–385.
16. Ножевникова А.Н., Русскова Ю.И., Литтм Ю.В., Паршина С.Н., Журавлева Е.А., Никитина А.А. // Микробиология. 2020. Т. 89 № 2. С. 131–151.
17. Voeikova T.A., Emel'yanova L.K., Novikova L.M., Shakulov R.S., Sidoruk K.V., Smirnov I.A. et al. // Microbiology. 2013. V. 82. № 4. P. 410–414.
18. Marzocchi U., Palma E., Rossetti S., Aulenta F., Scota A. // Water Res. 2020. V. 173. P. 115520. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115520>
19. Obileke K.C., Onyeaka H., Meyer E.L., Nwokolo N. // Electrochem. Commun. V. 125. 2021. P. 107003. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107003>
20. Wang X., Wan G., Shi L., Gao X., Zhang X., Li X. et al. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. V. 26. P. 31449–31462.
21. Самков А.А., Чугунова Ю.А., Круглова М.Н., Моисеева Е.В., Волченко Н.Н., Худокормов А.А. и др. // Прикл. биохимия и микробиол. 2023. Т. 59. № 2. С. 191–199.
22. Zhang Y., Ren J., Wang Q., Wang S., Li S., Li H. // Biochem. Eng. J. 2021. V. 168. P. 107930. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107930>
23. Chen C.-H., Chang C.-F., Ho C.-H., Tsai T.-L., Liu S.-M. // Chemosphere. 2008 V. 7. P. 1712–1720.
24. Хмелевцова Л.Е., Сазыкин И.С., Ажогина Т.Н., Сазыкина М.А. // Прикл. биохимия и микробиол. 2020. Т. 56. № 4. С. 327–335.
25. Hong Y., Guo J., Xu Z., Mo C., Xu M., Sun G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75. P. 647–654.
26. Xiao X., Xu C.-C., Wu Y.-M., Cai P.-J., Li W.-W., Du D.-L. et al. // Bioresour. Technol. 2012. V. 110. P. 86–90.
27. Lizárraga W.C., Mormontoy C.G., Calla H., Castaneda M., Taira M., Garcia R. et al. // Biotechnol. Rep. 2022. V. 33. P. e00704. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00704>
28. Cordas C.M., Nguyen G.-S., Valerio G.N., Jonsson M., Sollner K., Aune I.H. et al. // J. Inorg. Biochem. 2022. V. 226. P. 111651. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111651>
29. Tucci M., Viggi C.C., Núñez A.E., Schievano A., Rabaey K., Aulenta F. // Chem. Eng. J. 2021. V. 419. P. 130008. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130008>
30. Фалина И.В., Самков А.А., Волченко Н.Н. // Наука Кубани. 2017. № 2. С. 4–11.
31. Berezina N.P., Timofeev S.V., Kononenko N.A. // J. Membr. Sci. 2002. V. 209. P. 509–518.
32. Jadhav G.S., Ghangrekar M.M. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 717–723.

33. Tian J.-H., Pourcher A.-M., Klingelschmitt F., Le Roux S., Peu P. // J. Microbiol. Methods. 2016. V. 130. P. 148–153.
34. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N., Jr. // BMC Bioinform. 2006. V. 7. P. 85.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>
35. Satta E., Nanni I.M., Contaldo N., Collina M., Poveda J.B., Ramírez A.S. et al. // Molecular and Cellular Probes. 2017. V. 35. P. 1–7.
36. Heidelberg J.F., Paulsen I.T., Nelson K.E., Gaidos E.J., Nelson W.C., Read T.D. et al. // Nat. Biotechnol. 2002. V. 20. P. 1118–1123.
37. Yoshida T., Sugano Y. // Biochem. Biophys. Rep. 2023. V. 33. P. 101401.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101401>
38. Gonzalez-García J., Bonete P., Exposito E., Montiel V., Aldaza A., Torregrosa-Macia R. // J. Mater. Chem. 1999. № 9. P. 419–426.
39. Guo Y., Zong J., Gao A., Yu N. // Int. J. Electrochem. Sci. 2022. V. 17. Article Number: 220527.
<https://doi.org/10.20964/2022.05.47>
40. Singh R., Eltis L.D. // Arch. Biochem. Biophys. 2015. V. 574. P. 56–65.
41. Lončar N., Colpa D.I., Fraaije M.W. // Tetrahedron. 2016. V. 72. P. 7276–7281.
42. Chhabra M., Mishra S., Sreekrishnan T.R. // J. Biotechnol. 2009. V. 143. P. 69–78.
43. Parshetti G.K., Parshetti S.G., Telke A.A., Kalyani D.C., Doong R.A., Govindwar S.P. // J. Environ. Sci. (China). 2011. V. 23. № 8. P. 1384–1393.
44. Yang J., Zhang Y., Wang S., Li S., Wang Y., Wang S. et al. // J. Biosci. Bioeng. 2020. V. 130. № 4. P. 347–351.
45. Kalyani D.C., Patil P.S., Jadhav J.P., Govindwar S.P. // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. P. 4635–4641.
46. Li B.-B., Cheng Y.-Y., Fan Y.-Y., Liu D.-F., Fang C.-Y., Wu C. et al. // Sci. Total Environ. 2018. V. 637–638. P. 926–933.
47. Li C., Luo M., Zhou S., He H., Cao J., Luo J., et al. // Int. J. Hydrog. Energy. 2020. V. 45. № 53. P. 29417–29429.
48. Liu J., Fan L., Yin W., Zhang S., Su X., Lin H., et al. // J. Environ. Manage. 2023. V. 347. P. 119073.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119073>
49. Yu Y.-Y., Zhang Y., Peng L. // Sci. Total Environ. 2022. V. 838. № 3. P. 156501.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156501>

Decolorization of Crystal Violet by Mixed Culture under the Influence of Bioelectrochemical Stimulation

A.A. Samkov^a, E.V. Pankratova^{a, b}, M.N. Kruglova^a, A.V. Bespalov^a, S.M. Samkova^a,
N.N. Volchenko^a, and A.A. Khudokormov^a

^a Kuban State University, Krasnodar, 350040 Russia

^b University of Science and Technology “Sirius”, Krasnodar region, 354340 Russia

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

A significant variation in the relative representation of copies of bacterial genes of dye-decolorizing DyP peroxidases typical for the genus *Shewanella* and a number of other microorganisms was found in the bottom sediments of freshwater reservoirs. It was found that the specific rate of decolorization of crystal violet in a laboratory bioelectrochemical system by a mixed culture of bottom sediments, which showed the highest representation of DyP genes, depended on the method of electrical stimulation of the external circuit and the concentration of the dye. After an increase in the concentration of more than 20 microns, the maximum speed was achieved in the presence of an ionistor polarly connected to the external electrical circuit of the bioelectrochemical system and amounted to $3.23 \pm 0.11 \mu\text{M/h}$, while with the opposite polarity connection, a minimum value of $2.07 \pm 0.08 \mu\text{M/h}$ was observed. In the case of an open circuit and a resistor, similar indicators occurred – 2.88 ± 0.09 and $2.67 \pm 0.12 \mu\text{M/h}$, respectively. When analyzing the decolorization products, a consistent decrease in the maxima of the absorption bands of the dye was noted, indicating its more complete degradation by mixed culture. The results may be of interest for the development of methods to improve the efficiency of bioelectrochemical methods of environmental biotechnology, by electrostimulation of the external circuit.

Keywords: bioelectrochemical system, dye-decolorizing DyP peroxidase, crystal violet, triphenylmethane dye, bioelectrocatalysis, decolorization, microbial fuel cell