

УДК 579.66, 579.222.4

ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ В БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК *Shewanella oneidensis* MR-1 НА ПОВЕРХНОСТИ АНОДА И ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ВНЕШНЕЙ ЦЕПИ

© 2023 г. А. А. Самков^{1, *}, Ю. А. Чугунова^{1, 2}, М. Н. Круглова¹, Е. В. Моисеева¹, Н. Н. Волченко¹,
А. А. Худокормов¹, С. М. Самкова¹, Э. В. Карасева¹

¹Кубанский государственный университет, Краснодар, 350040 Россия

²Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, 350063 Россия

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Поступила в редакцию 20.08.2022 г.

После доработки 27.09.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Обнаружено влияние полярности электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы, а также иммобилизации на аноде клеток *Shewanella oneidensis* MR-1, содержащих ген пероксидаз класса DuP, на скорость обесцвечивания красителей разных типов. Для красителя трифенилметанового кристаллического фиолетового максимальная скорость обесцвечивания суспендированными клетками *S. oneidensis* MR-1 составила 2.05 ± 0.07 мкМ/ч и наблюдалась при подключении источника постоянного напряжения 1.2 В прямой полярности. Минимальные скорости наблюдались в случае обратной полярности подключения. При иммобилизации клеток на аноде удельная скорость обесцвечивания была выше, достигая 2.91 ± 0.09 мкМ/ч и не снижалась при повышении концентрации субстрата. Наименьшие показатели также были отмечены для обратного подключения источника напряжения. При обесцвечивании азокрасителя конго красного, максимальные значения скорости отмечены для источника с прямым подключением ионистора и при разомкнутой цепи (0.26 ± 0.01 и 0.29 ± 0.02 мкМ/ч соответственно), минимальное значение 0.11 ± 0.02 мкМ/ч наблюдали для обратного подключения. Для продуктов биоэлектрокаталитического обесцвечивания кристаллического фиолетового обнаружено значительное снижение интенсивности главного пика поглощения, соответствующего полосе 590 нм, практически без гипсохромного сдвига. О качественных изменениях состава продуктов обесцвечивания говорит появление нового максимума поглощения в районе 360 нм для варианта с прямой полярностью подключения ионистора. Результаты могут представлять интерес для разработки новых методов биоэлектрохимической очистки.

Ключевые слова: биоэлектрохимическая система, *Shewanella oneidensis* MR-1, кристаллический фиолетовый, конго красный, биоэлектрокатализ, обесцвечивание, анод, микробный топливный элемент

DOI: 10.31857/S0555109923020125, **EDN:** LVGKHT

Воздействие различных биоэлектрохимических процессов на функционирование биологических систем привлекает в настоящее время все более пристальное внимание исследователей. Расширение поля задач в этой области связано со многими нерешенными вопросами, возникшими при анализе работы микробных топливных элементов, исходя из созданных в качестве альтернативного источника энергии. Данные устройства обнаруживали возможность использования для нужд экологической биотехнологии и разработки биосенсоров [1–4]. Получены многочисленные экспериментальные подтверждения изменения интенсивности биологической деградации раз-

личных веществ, в анаэробных условиях анодной зоны микробных топливных элементов [5, 6].

Известно, что происходящая в естественных условиях природных сред и микробиоценозов поляризация поверхности электрода, даже будучи ограничена величиной порядка от сотен мВ (на практике) до теоретических 1.105 В [7], способна влиять на биохимические процессы на границе раздела фаз электрод-жидкость.

Существует значительный пул исследований влияния биоэлектрохимических условий на процессы, происходящие в условиях сложных микробиоценозов непостоянного систематического состава, меняющихся в зависимости от ряда фак-

торов. При этом состав микробиоценоза может зависеть даже от освещенности анода. Так в работе Хиаохуан Ванг с соавт. [8] было обнаружено, что освещение обуславливает замещение псевдомонадами доминировавших в условиях отсутствия освещения представителей рода *Geobacter*. При исследованиях, открывших возможность влияния внешней электрической стимуляции на метаногенез, также было отмечено изменение состава микробиоценоза под действием внешнего напряжения 1.2 вольта. В работе [9] обнаружили, что биоэлектрохимическое воздействие стимулировало бродильщиков и гидрогенотрофных метаногенов, увеличивая продукцию метана в 8.6 раза. Таким образом, переход к более простой экспериментальной модели, включающей одну чистую культуру, позволяет исключить фактор смены состава сообщества.

К настоящему моменту известны работы, доказавшие возможность стимуляции слабыми внешними напряжениями, порядка десятых вольта, биодеструкционной активности, а также соответствующего роста экспрессии генов ключевых ферментов, на примере биodeградации *Pseudomonas sp.* DGYH-12 фенантрена [10], но вопросы кинетики процессов и оценки влияния на нее параметров внешней цепи, в том числе искусственной стимуляции, остаются в значительной мере открытыми.

Таким образом, простая модель на основе чистой культуры *S. oneidensis* MR-1, часто используемой в биоэлектрохимических системах [11, 12], позволит проверить влияние различных вариантов внешней электрической стимуляции реакций в анаэробной зоне. Целью стимуляции являются изменения качественных или количественных характеристик окислительно-восстановительных реакций, осуществляемых ассоциированными с анодом бактериями, обесцвечивающими редокс-устойчивые красители. Известно, что за обесцвечивание красителей отвечают, в том числе, бактериальные ферменты класса пероксидаз [13]. Обнаружено, что многие представители рода *Shewanella*, в том числе *S. oneidensis* MR-1 [14] имеют выраженную способность обесцвечивать различные красители, благодаря развитой системе ферментов, в том числе азоредуктаз и, прежде всего, пероксидаз класса DyP или краситель-обесцвечивающих пероксидаз (dye decolorizing peroxidases), действие которых может быть оценено по убыли субстрата в реальном времени [15–17]. Рассматривая чистую культуру шеванеллы как биологический агент биоэлектрохимической системы, в которой происходит обесцвечивание красителя, необходимо отметить сохранение ключевой роли экзоэлектрогенных микроорганизмов, опосредующих взаимодействие электрода и внешней среды также и в открытых системах [18]. Таким образом, полученные данные могут быть экстраполированы на более

сложные микробиоценозы, воздействие на которые через электроды биоэлектрохимических систем, конструктивно представляющих собой микробный топливный элемент (МТЭ) безмембранного типа, позволит влиять на биоремедиационные процессы уже в открытой системе.

Цель работы — экспериментально определить возможность влияния посредством внешней электрической стимуляции биоэлектрохимической системы слабыми напряжениями разной полярности на скорость обесцвечивания красителей культурой *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях анодной камеры МТЭ.

МЕТОДИКА

В работе использовали штамм бактерий *S. oneidensis* MR-1, полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (№ в каталоге В-9861). Штамм выделен в 1987 г. из ила озера Онейдо, филогения описана Ивановой с соавт. [19] в 2004, относится к γ -протеобактериям. Штамм широко используется в научно-исследовательской деятельности в качестве экзоэлектрогенного микроорганизма, активно осуществляющего электрогенез и другие биохимические процессы [20].

В качестве биоэлектрохимической системы использовали МТЭ мембранного воздушнокатодного типа с объемом анодной камеры 69 мл [21]. Материалом электродов послужил углеродный войлок НТМ-200М (АО “НИИЭИ”, Россия) толщиной 4 мм, анод имел размер 20 × 50 мм, катод представлял собой диск из аналогичного материала диаметром 18 мм, капиллярно смачиваемый дистиллированной водой и прилегающий к катионообменной мембране МФ-4СК (ОАО “Пластполимер”, Россия). Обратная сторона диска контактировала с воздухом. Анод и катод контактировали со внешней цепью через графитовые стержни, вставленные в войлок. Перед использованием мембраны МФ-4СК переводили в протонную форму по стандартной методике окислительно-термического кондиционирования перфторированных мембран [22].

В роли среды анодной камеры использовали модельную 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 [23]. В качестве источника углерода и энергии применяли пептон (1 г/л).

Клетки *S. oneidensis* MR-1 выращивали на питательном агаре. Трехсуточную культуру смывали минеральной основой среды, дважды отмывали той же средой и вносили в анодные камеры.

Детали МТЭ, контактирующие с содержимым камер, стерилизовали автоклавированием. В ро-

ли биологического агента в камеры, заполненные стерильной средой, вносили *S. oneidensis* MR-1 либо в виде суспензии с конечной концентрацией в анодной камере 2×10^7 кл./мл, либо предварительно адсорбционно иммобилизованными на поверхности анода из НТМ-200М в среде минеральной основы используемой модельной сточной воды. Количество адсорбированных на аноде клеток учитывали по убыли их титра в среде для иммобилизации. Обеспечивали равенство биомассы клеток, вносимых в анодные камеры в суспендированном и адсорбированном виде.

Инкубирование МТЭ велось на орбитальных качалках Biosan Multi Shaker Psu 20i (“Biosan”, Латвия) при 60 об./мин при 25°C.

Для приложения внешней разности потенциалов использовали ионисторы Maxwell BCAP0350 E270 T11 (“Maxwell”, Китай) емкостью 350 Ф, отличающиеся низким током саморазряда 0.3 мА и предварительно заряженные до напряжения 1.2 В.

Измерение оптической плотности выполняли на спектрофотометре Leki SS2107 (“LEKI Instruments”, Финляндия) в спектрофотометрических кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм при длинах волн 590 нм (кристаллический фиолетовый) или 480 нм (конго красный). Регистрацию оптических спектров поглощения проводили с использованием программного обеспечения Leki ScanPro.

Использовали красители кристаллический фиолетовый и конго красный (АО “Вектон”, Россия), ЧДА.

Для осаждения клеток применяли центрифугу РС-6МЦ (“Dastan”, Киргизия).

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

Выделение тотальной ДНК из чистых культур бактерий осуществляли набором diaGene 3318 (“Диаэм”, Россия). Для проведения амплификации применяли набор БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2х) (“Биолабмикс”, Россия). ПЦР осуществляли в амплификаторе Authorized Thermal Cycler (“Eppendorf”, Германия). Использовали вырожденные праймеры для широкого круга бактериальных обесцвечивающих красителей пероксидаз, прямой 5'-GAYCTGTGCTTYGARCTSGC-3', обратный 5'-ASCCGATRAARTASGTGCC-3' [24] (“Синтол”, Россия). Продукты ПЦР визуализировали при проведении электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Применяли ДНК-маркер “Sky-High” (ООО “Биолабмикс”, Россия).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента, а также

U-критерия Манна–Уитни. Достоверным считали различие при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для штамма *S. oneidensis* MR-1 в ходе предварительных экспериментов была обнаружена способность к обесцвечиванию водных растворов кристаллического фиолетового и ряда других красителей в анаэробных условиях анодной камеры МТЭ. При помощи вырожденных праймеров, позволяющих выявлять широкий круг бактериальных генов пероксидаз класса DyP (обесцвечивающие красители пероксидазы), у используемой культуры *S. oneidensis* MR-1 было обнаружено присутствие возможного гомолога данного гена с характерным размером ампликона порядка 400 н.п. [24]. В случае примененного в качестве отрицательного контроля штамма *E. coli* M17 продукты отсутствовали, обнаруживаясь при использовании штамма *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д, который использовали как положительный контроль. Штамм *R. erythropolis* ВКМ Ас-2017Д известен значительной деструктивной активностью в отношении широкого круга углеводородных субстратов и применением в экологической биотехнологии [25, 26].

МТЭ перед внесением обесцвечиваемого субстрата выдерживали в течение трех сут для выравнивания в анодных камерах разных ячеек условий, о чем судили по сходным значениям разностей потенциалов между анодом и катодом, формируемых электрогенной культурой *S. oneidensis* MR-1. После этого к аноду и катоду подключали один из трех вариантов внешних электрических цепей: пассивное сопротивление (резистор 1 КОм), заряженный до напряжения 1.2 В ионистор с прямой полярностью подключения (отрицательный полюс подключен к аноду МТЭ), либо аналогичный ионистор с обратной полярностью подключения (положительный полюс к аноду). Ионисторы выступали в качестве источника тока и напряжения. При отсутствии резистора или ионистора цепь считалась разомкнутой.

Для предупреждения осаждения клеток *S. oneidensis* MR-1 на дно анодных камер и для оптимизации массопереноса МТЭ размещали на движущейся платформе орбитального шейкера при температуре 25°C и 100 об./мин. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях.

В анодные камеры вносили концентрированный раствор одного из красителей — кристаллического фиолетового или конго красного до конечной концентрации 2.5 мг/л, фиксируя динамику оптической плотности при длине волны, соответствующей максимуму поглощения водного раствора данного красителя. По истечении 1 сут инкубации краситель вносили повторно,

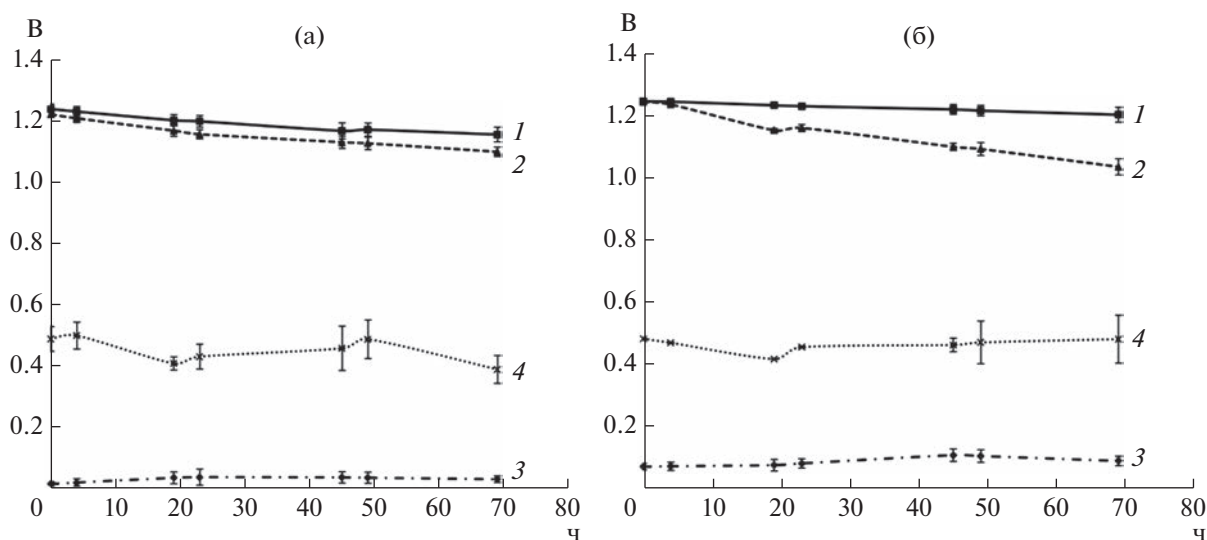


Рис. 1. Динамика разности потенциалов между электродами биоэлектрохимических систем в ходе обесцвечивания кристаллического фиолетового суспензированными (а) и иммобилизованными (б) клетками *S. oneidensis* MR-1 в зависимости от условий электрической стимуляции внешней цепи: 1 – ионистор прямой полярности подключения; 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 КОм, 4 – разомкнутая цепь.

ступенчато увеличивая концентрацию на 7.5 мг/л в сут (расчетные концентрации 2.5, 10.0 и 17.5 мг/л), периодически фиксируя оптическую плотность. Такая схема эксперимента была сформирована для возможности оценки зависимости удельной скорости обесцвечивания красителя, а также и от концентрации данного субстрата.

После 3 сут инкубации в холостом режиме, начиная с момента первого внесения красителей, дополнительно фиксировали разности потенциалов между катодом и анодом. Для варианта “ионистор “–”” (ионистор с обратной полярностью подключения, то есть положительный полюс подключен к аноду, а отрицательный к катоду) приведены модули значений, для расположения графиков напряжения в положительной координатной полуплоскости. Полученные результаты показаны на рис. 1.

При естественной поляризации иммобилизованные клетки давали небольшой прирост разности потенциалов по сравнению со свободными. Разница была значительной при наличии во внешней цепи резистора, замыкавшего цепь и снижавшего данный показатель. Колебания напряжения, заметные в случае разомкнутой цепи, совпадали со временем внесения красителя и могли быть связаны как со стрессовым воздействием субстрата на культуру, так и с повышением окислительно-восстановительного потенциала камеры из-за попадания в нее кислорода. Значительный интерес представлял график разряда ионисторов: при подключении отрицательным полюсом к катоду (“ионистор “–””) разряд происходил значительно быстрее по сравнению с прямой полярностью (“ионистор “+””), что было более выражено

при условии иммобилизации клеток. Таким образом, наличие биологического агента, локализованного на границе раздела фаз электрод/жидкость, заметно увеличивало эффективность переноса электрического заряда при обратной полярности подключения.

Для исследования кинетических параметров обесцвечивания кристаллического фиолетового, после отбора проб через герметичные отводы и осаждения клеток в центрифуге, проводили оценку оптической плотности при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения красителей. Динамика оптической плотности, в соответствии с тремя внесениями красителя, имела ступенчатый характер (рис. 2). По скорости снижения показателя в течение 3 ч после каждого очередного добавления субстрата оценивали удельную скорость реакции. При использовании суспензированных клеток *S. oneidensis* MR-1 в эксперименте с кристаллическим фиолетовым имело место значительное влияние как наличия биологического агента, так и устройства внешней цепи, в разной степени влияющих на динамику обесцвечивания субстрата. Некоторое снижение D_{590} в стерильном контроле, после первого внесения красителя до концентрации 2.5 мг/л, могло быть связано с адсорбцией красителя на развитой поверхности войлока НТМ-200М. После второго и последующего внесения дальнейшего уменьшения D_{590} в условиях стерильной среды практически не происходило. Необходимо отметить более выраженную интенсивность обесцвечивания при использовании суспензированных клеток и применении во внешней цепи ионистора, поднимающего разность по-

тенциалов между анодом и катодом до 1.2 В, с соблюдением естественной полярности, формирующейся в МТЭ.

На рис. 2б показана динамика снижения D_{590} раствора кристаллического фиолетового при ступенчатом внесении в анодную камеру МТЭ в зависимости от внешней цепи в том случае, когда на аноде были предварительно адсорбционно иммобилизованы клетки *S. oneidensis* MR-1.

Локализация клеток *S. oneidensis* MR-1 на границе раздела анод/среда значительно влияла на динамику обесцвечивания вносимого поэтапно красителя, что иллюстрировалось более интенсивным снижением показателя при использовании иммобилизованных клеток в течение первых 4 ч после каждого очередного добавления кристаллического фиолетового, относительно последующих 20 ч инкубации, до следующего цикла повышения концентрации.

Для оценки зависимости кинетических параметров обесцвечивания кристаллического фиолетового от режима внешней электрической цепи были построены графики зависимости удельной скорости реакции от концентрации красителя для всех вариантов цепей (резистор, подключенные прямой и обратной полярностью ионисторы, разомкнутая цепь) и локализации клеток (супендированные либо иммобилизованные на аноде). Поскольку наибольшая интенсивность обесцвечивания имела место в первые 4 ч после внесения субстрата, этот диапазон представлял наибольший интерес как с теоретической, так и с практической (проточные системы очистки) точки зрения. Результаты приведены на рис. 3.

Локализация клеток в наиболее электрохимически активной зоне на поверхности анода, значительно влияла на зависимость кинетики обесцвечивания трифенилметанового красителя от концентрации субстрата. В случае супензии клеток при достижении концентрации субстрата около 20 мкМ, наблюдалось устойчивое снижение удельной скорости реакции для всех вариантов внешних цепей. При этом приложение внешнего источника тока и разности потенциалов в соответствии с полярностью микробных топливных элементов, где отрицательно заряженный электрод — анод в МТЭ выполнял функцию приема электронов, обеспечило почти двукратное повышение максимальной скорости по сравнению с остальными вариантами. Максимальная скорость в этом случае достигала 2.05 ± 0.07 мкМ/ч, при разомкнутой цепи — 1.30 ± 0.08 , использовании ионистора с обратной полярностью — 0.83 ± 0.04 , резистора — 1.10 ± 0.07 мкМ/ч. В случае адсорбированных клеток в этом же диапазоне концентраций субстрата снижение удельной скорости обесцвечивания не происходило, показатели достигали для трех вариантов (разомкнутая цепь, ионистор с прямой по-

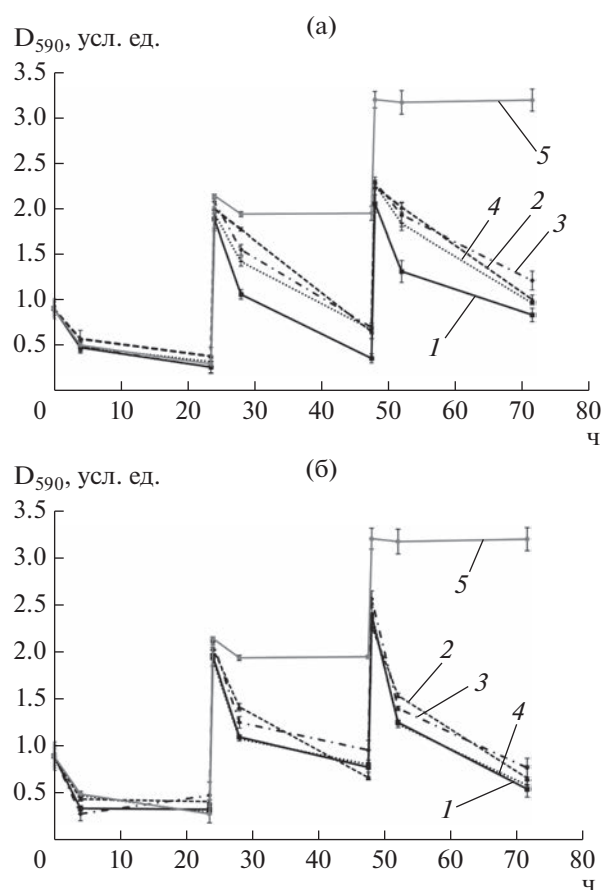


Рис. 2. Динамика изменения D_{590} раствора кристаллического фиолетового при ступенчатом внесении в анодную камеру МТЭ в присутствии супендированных (а) и иммобилизованных на аноде (б) клеток *S. oneidensis* MR-1, в зависимости от условий электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы: 1 — ионистор прямой полярности подключения, 2 — ионистор обратной полярности подключения, 3 — резистор 1 КОм, 4 — разомкнутая цепь, 5 — контроль.

лярностью подключения, резистор) близких значений — 2.78 ± 0.05 — 2.91 ± 0.09 мкМ/ч. В случае ионистора с обратной полярностью обнаружено низкое значение скорости — 2.09 ± 0.05 мкМ/ч.

Для проверки гипотезы влияния принудительной поляризации на биоэлектрохимические процессы обесцвечивания красителей был поставлен аналогичный эксперимент с азокрасителем конго красным, существенно отличающимся по строению молекулы. Для супензионных клеток *S. oneidensis* MR-1 была построена зависимость удельной скорости обесцвечивания данного красителя от концентрации субстрата при условиях внешней цепи, аналогично предыдущему эксперименту с кристаллическим фиолетовым (рис. 4).

При сходных показателях резистора, положительно подключенного ионистора и разомкнутой

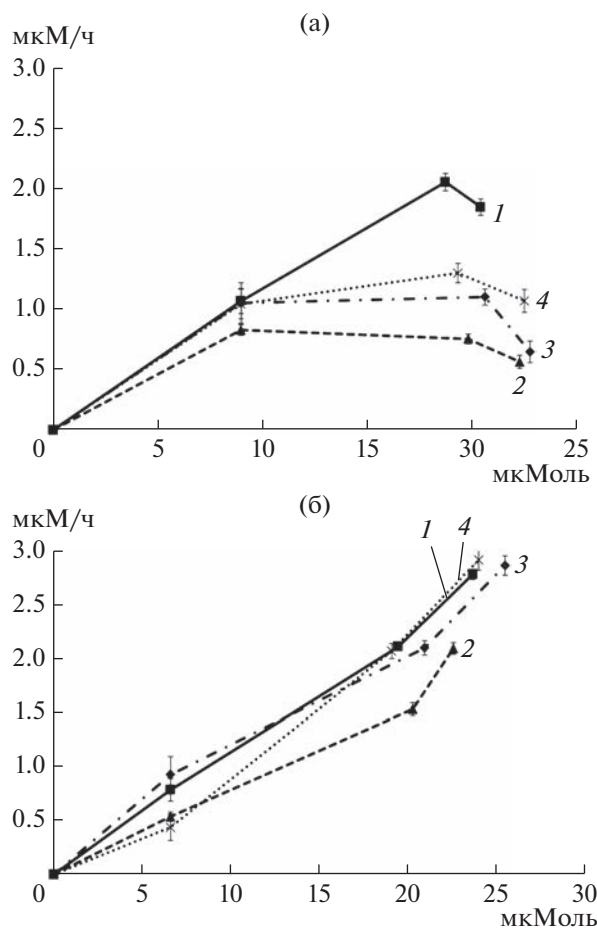


Рис. 3. Удельная скорость обесцвечивания кристаллического фиолетового суспендированными (а) и иммобилизованными на аноде (б) клетками *S. oneidensis* MR-1 в зависимости от условий электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы и концентрации красителя: 1 – ионистор прямой полярности подключения, 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 КОм, 4 – разомкнутая цепь.

цепи, вариант опыта с подключенным отрицательной полярностью ионистором отличался минимальными показателями удельной скорости, что соответствовало результатам предыдущего эксперимента с кристаллическим фиолетовым. Сходство показателей удельной скорости обесцвечивания с применением резистора, положительно подключенного ионистора и разомкнутой цепи, целесообразно связать с общей низкой скоростью обесцвечивания данного красителя используемой культурой. Максимальный показатель не превышал 0.3 мкМ/ч, что практически на порядок меньше скоростей обесцвечивания кристаллического фиолетового.

Известно, что N-деметилирование и расщепление сопряженной хромофорной структуры являются наиболее распространенными путями

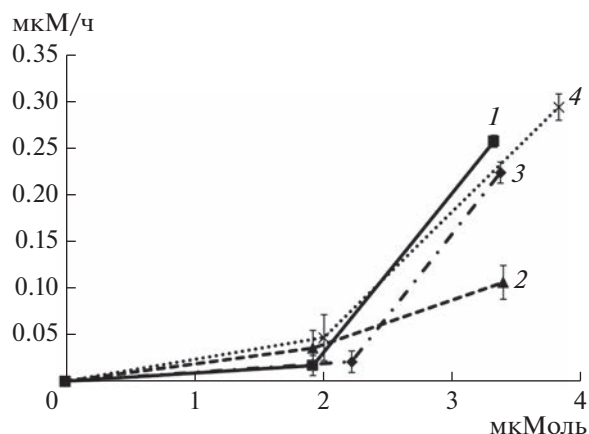


Рис. 4. Зависимость удельной скорости обесцвечивания (мкМ/ч) конго красного клетками *S. oneidensis* MR-1 от условий электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы и концентрации красителя: 1 – ионистор прямой полярности подключения, 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 КОм, 4 – разомкнутая цепь.

биологической деградации трифенилметановых красителей [27–29]. Для общей оценки возможного изменения состава продуктов распада кристаллического фиолетового, после проведения эксперимента с обесцвечиванием, дополнительно были проанализированы оптические спектры поглощения, в области максимума поглощения исследуемого вещества в диапазоне длин волн от 330 до 830 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 с суспензионными клетками *S. oneidensis* MR-1, а также для контроля, приведены на рис. 5.

Для всех экспериментальных вариантов характерно значительное снижение интенсивности главного пика поглощения красителя, соответствующего полосе 590 нм. При этом обращает на себя внимание отсутствие или относительно малые (в пределах 5–10 нм) гипсохромные сдвиги основной полосы с максимумом поглощения 590 нм и коротковолнового плеча, даже при высоких степенях разложения. Для резистора 1 КОм основная полоса находилась на 585 нм, “ионистор “+”” – 580 нм, “ионистор “–”” – 590 нм, разомкнутая цепь – 585 нм. В то же время в работе [30], в которой были изучены спектры кристаллического фиолетового после воздействия пероксидазы класса DyP (обесцвечивающей краситель пероксидазы) из *Bacillus amyloliquefaciens*, был показан сдвиг основного пика и коротковолнового плеча в коротковолновую область, составляющий десятки нанометров, до значения 547.5 нм. Это было интерпре-

тировано как признак разрушения сопряженной хромофорной структуры и удаления электроно-донорной группы, на что также указано в работах других авторов [31, 32]. Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о более полном процессе деградации красителя до не поглощающих в данном спектральном диапазоне соединений.

Отмечено сохранение полос поглощения в коротковолновой области, что может быть связано с накоплением продуктов распада кристаллического фиолетового, основная полоса поглощения которого находится при 590 нм, а также иных микробных метаболитов. При этом, для большинства экспериментальных вариантов основной максимум поглощения приходился на 340–345 нм (в контроле — 340 нм), в то время как вариант “ионистор +” показал появление нового максимума поглощения в коротковолновой области, в районе 360 нм при сохранении заметного плеча на 340 нм. Известно, что продуктами распада кристаллического фиолетового могут быть N,N-диметил-N',N'-диметил-N"-метилпарарозанилин, N,N-диметил-N',N'-диметилпарарозанилин, N,N-диметилпарарозанилин, N-метилпарарозанилин, 4,4'-бис(диметиламино)бензофенон (кетон Михлера), 4-(N-метиламино)-4'-(N'-метиламино)бензофенон, 4-(N-метиламино)-4'-аминобензофенон, N, N-диметиланилин, бензохинон) [30], причем для *Shewanella* наиболее характерными являются N,N-диметиламинобензальдегид и кетон Михлера [33].

Таким образом, различия в расположении полос поглощения продуктов обесцвечивания кристаллического фиолетового чистой культурой *S. oneidensis* MR-1 указывают не только на количественные, но и качественные изменения процесса в разных биоэлектрохимических условиях, наиболее выраженных при стимулировании внешним источником слабого электрического поля и напряжения, подключенного в соответствии с естественной полярностью микробного топливного элемента, выступающего в качестве реактора. Эффект стимулирования или ингибирования обесцвечивания проявлялся в условиях низкого окислительно-восстановительного потенциала анодной камеры биоэлектрохимической системы. За счет естественной поляризации поверхности электродов (разомкнутая цепь и резистор 1 КОм) или, что более выражено, при положительной стимуляции ионистором прямого подключения, могло происходить ускорение процесса N-деметилирования, расщепление одного из ароматических колец и иных ключевых реакций обесцвечивания. Данные реакции могут быть связаны с потоком восстановительных эквивалентов, передаваемых шewanеллой вовне цитохромами наружной мембраны, а также через переносчик рибофлавин в условиях наличия искусственного акцептора электронов — отрицательно заряженного анода. Напротив, при подключении

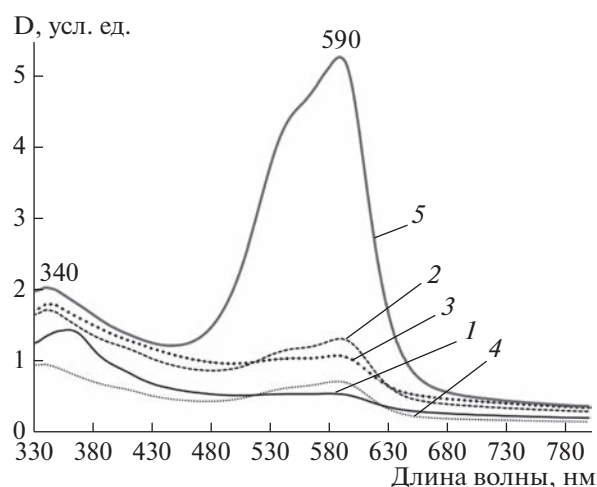


Рис. 5. Спектры поглощения продуктов разложения кристаллического фиолетового культурой *S. oneidensis* MR-1 в зависимости от условий электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы: 1 — ионистор прямой полярности подключения, 2 — ионистор обратной полярности подключения, 3 — резистор 1 КОм, 4 — разомкнутая цепь, 5 — контроль.

ионистора с обратной полярностью данный эффект мог нивелироваться, так как анод имел противоположный знак заряда. Сопряжение реакций биodeградации красителей, электрогенеза (*S. oneidensis* MR-1) и возможных электрохимических процессов на аноде зависит, таким образом, от знака заряда внешнего источника тока и напряжения, подключенного к электродам биоэлектрохимической системы. Химизм реакции восстановления азосвязи, приводящей к обесцвечиванию азокрасителей в анаэробных условиях, упоминаемый в работе российских авторов [34], позволяет предположить связь экзоэлектрогенной активности *S. oneidensis* MR-1 с передачей энергии, поступающей в биоэлектрохимическую систему через внешнюю цепь от источника тока, что катализировало или ингибировало реакции восстановления азосвязей и обесцвечивание конго красного, в зависимости от полярности подключения. В исследовании Чао Ли с соавт. [35] восстановление и разрыв двойной связи между атомами азота, приводящие к обесцвечиванию конго красного, также связывали с электроактивными бактериальными биопленками на аноде микробного топливного элемента. Авторы констатировали ускорение обесцвечивания при замкнутой цепи по сравнению с разомкнутой. Это согласуется с положительным влиянием на обесцвечивание красителей интенсификации переноса заряда и иных электрохимических процессов на поверхности анода, в результате стимуляции внешним источником тока и напряжения, усиливающим естественную разность потенциалов между электродами.

Таким образом, при обесцвечивании трифенилметанового красителя кристаллического фиолетового и азокрасителя конго красного культурой *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях анодной камеры биоэлектрохимической системы было обнаружено влияние полярности подключения к электродам внешнего источника тока и напряжения. Увеличение удельной скорости реакции при ступенчатом повышении концентрации субстрата было отмечено для вариантов опыта, где происходила поляризация электродов, как естественная, до 0.59 В, за счет электрогенеза *S. oneidensis* MR-1, так и более выраженная искусственная — в условиях положительной стимуляции источником постоянного тока и напряжения 1.2 В прямого подключения (отрицательный полюс к аноду, положительный — к воздушному катоду). При обратном подключении источника напряжения положительным полюсом к аноду во всех случаях наблюдалось снижение удельной скорости обесцвечивания как для кристаллического фиолетового так и для конго красного, что сопровождалось повышенным расходом электрического заряда используемого в качестве источника тока и напряжения ионистора. Имобилизация клеток на поверхности анода значительно усиливала скорость обесцвечивания кристаллического фиолетового по сравнению с суспендированными клетками, при этом, негативный эффект обратного подключения ионистора сохранялся. Таким образом, искусственная внешняя поляризация электродов биоэлектрохимической системы позволяла как положительно, так и отрицательно влиять на осуществляемые электрогенной культурой реакции, приводящие к обесцвечиванию красителей разных типов в анаэробной среде анодной камеры. Экзоэлектрогенная активность клеток *S. oneidensis* MR-1, способных к передаче заряда вовне, при помощи систем цитохромов и специальных клеточных структур, может обеспечивать сопряжение внешней электрической цепи и энергоемких биохимических процессов, происходящих в прилегающем объеме, в том числе восстановления и разрыва двойной связи между атомами азота в молекуле конго красного, N-деметилирования и расщепления сопряженной хромофорной структуры кристаллического фиолетового.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-24-00401, <https://rscf.ru/project/22-24-00401/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дебабов В.Г. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 2. С. 149–157.
2. Решетилов А.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 268–274.
3. Li W.-W., Yu H.-Q. // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. P. 1–12.

4. Алферов С.В., Арлянов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 637–643.
5. Самков А.А., Волченко Н.Н., Худокормов А.А., Калашников А.А., Веселовская М.В. // Политематический сетевой электронный научный журн. Кубанского государственного аграрного университета. 2014. № 101. С. 496–510.
6. Idris M.O., Kim H.-C., Yaqoob A.A., Ibrahim M.N.M. // Sust. Energy Technol. Assess. 2022. V. 52. B. 102183.
7. Obileke Ke C., Onyeaka H., Meyer E.L., Nwoko N. // Electrochem. Commun. 2021. V. 125. P. 1–14.
8. Wang X., Hu J., Chen Q., Zhang P., Wu L., Li J. et al. // Water Res. 2019. V. 156. P. 125–135.
9. Zhi Z., Pan Y., Lu X., Wang J., Zhen G. // Sci. Total Environ. 2022. V. 814. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152736>
10. Wang X., Wan G., Shi L., Gao X., Zhang X., Li X., Zhao J., Sha B., Huang Z. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. V. 26. P. 31449–31462. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05670-5>
11. Воейкова Т.А., Емельянова Л.К., Новикова Л.М., Мордкович Н.Н., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Микробиология. 2012. Т. 81. № 3. С. 339–344.
12. Воейкова Т.А., Емельянова Л.К., Новикова Л.М., Шакулов Р.С., Сидорук К.В., Смирнов И.А. и др. // Микробиология. 2013. Т. 82. № 4. С. 402–407.
13. Хмелевцова Л.Е., Сазыкин И.С., Ажогина Т.Н., Сазыкина М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 327–335.
14. Yang C., Zhang J., Zhang B., Liu D., Jia J., Li F., Song H. // Synth. Syst. Biotechnol. 2022. V. 7. P. 918–927.
15. Hong Y., Guo J., Xu Z., Mo C., Xu M., Sun G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75. P. 647–654.
16. Xiao X., Xu C.-C., Wu Y.-M., Cai P.-J., Li W.-W., Du D.-L., Yu H.-Q. // Bioresour. Technol. 2012. V. 110. P. 86–90.
17. Lizárraga W.C., Mormontoy C.G., Calla H., Castaneda M., Taira M., Garcia R., Marín C., Abanto M., Ramirez P. // Biotechnol. Rep. 2022. V. 33. P. 1–7.
18. Shi J., Zhao S., Yu X., Zhou T., Khan A., Yu Z., Feng P., Wang J., Liu P., Li X. // Int. J. Hydrog. Energy. 2019. V. 44. P. 10091–10101.
19. Ivanova E.P. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1773–1788.
20. Bose S., Hochell M.F. Jr., Gorby Y.A., Kennedy D.W., McCready D.E., Madden A.S., Lower B.H. // Geochim. Cosmochim. Acta. 2009. V. 73. P. 962–976.
21. Фалина И.В., Самков А.А., Волченко Н.Н. // Наука Кубани. 2017. № 2. С. 4–11.
22. Berezina N.P., Timofeev S.V., Kononenko // J. Membr. Sci. 2002. V. 209. P. 509–518.
23. Jadhav G.S., Ghangrekar M.M. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 717–723.
24. Tian J.-H., Pourcher A.-M., Klingelschmitt F., Le Roux S., Pei P. // J. Microbiol. Methods. 2016. V. 130. P. 148–153.
25. Самков А.А., Джимак С.С., Барышев М.Г., Волченко Н.Н., Худокормов А.А., Самкова С.М., Карасева Э.В. // Биофизика. 2015. Т. 60. № 1. С. 136–142.

26. Самков А.А., Волченко Н.Н., Худокормов А.А., Самикова С.М., Карасева Э.В. // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 1. С. 194–202.
27. Chhabra M., Mishra S., Sreekrishnan T.R. // J. Biotechnol. 2009. V. 143. P. 69–78.
28. Singh R., Eltis L.D. // Arch. Biochem. Biophys. 2015. V. 574. P. 56–65.
29. Lončar N., Colpa D.I., Fraaije M.W. // Tetrahedron. 2016. V. 72. P. 7276–7281.
30. Zhang Y., Ren J., Wang Q., Wang S., Li S., Li H. // Biochem. Eng. J. 2021. V. 168. P. 1–8.
31. Kalyani D.C., Patil P.S., Jadhav J.P., Govindwar S.P. // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. P. 4635–4641.
32. Sathishkumar P., Balan K. Palvannan T., Kamala–Kannan S., Oh B.-T., Rodríguez–Couto S. // Clean (Weinh). 2013. V. 41. P. 665–672.
33. Chen C.-H., Chang C.-F., Ho C.-H., Tsai T.-L., Liu S.-M. // Chemosphere. 2008. V. 72. P. 1712–1720.
34. Емашова Н.А., Котова И.Б., Непрусов А.И., Калужный С.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. С. 195–201.
35. Li C., Luo M., Zhou S., He H., Cao J., Luo J., Fang F. // Int. J. Hydrog. Energy. 2020. V. 45. P. 29417–29429.

Decolorization of Dyes in the Bioelectrochemical System Depending on the Immobilization of *Shewanella oneidensis* MR-1 Cells on the Anode Surface and Electrical Stimulation of the External Circuit

A. A. Samkov^{a, *}, Yu. A. Chugunova^{a, b}, M. N. Kruglova^a, E. V. Moiseeva^a, N. N. Volchenko^a,
A. A. Khudokormov^a, S. M. Samkova^a, and E. V. Karaseva^a

^aKuban state university, Krasnodar, 350040 Russia

^bKuban State Medical University, Krasnodar, 350063 Russia

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

The effect of the polarity of the electrical stimulation of the external circuit of the bioelectrochemical systems, as well as the immobilization of *Shewanella oneidensis* MR-1 cells containing the DyP peroxidase gene on the rate of discoloration of dyes of different types was found. For the crystal violet triphenylmethane dye, the maximum decolorization rate by suspended *S. oneidensis* MR-1 cells $2.05 \pm 0.07 \mu\text{M/h}$ was noted in the case of connecting a 1.2 V direct polarity DC voltage source. One of the minimum rates was observed in the case of reverse polarity of the connection. In the case of cells immobilized on the anode, the rate was higher, reaching $2.91 \pm 0.09 \mu\text{M/h}$ and did not decrease with increasing substrate concentration. The lowest values were also noted for the reverse connection of the voltage source. In case of the azo dye congo red, the maximum rate was found for a source with direct connection and an open circuit (0.26 ± 0.01 and $0.29 \pm 0.02 \mu\text{M/h}$, respectively), the minimum value is $0.11 \pm 0.02 \mu\text{M/h}$ for reverse connection. For the crystal violet decolorization products, a significant decrease in the intensity of the main absorption peak at 590 nm band was found, with no notable hypsochromic shift. The qualitative changes in the decolorization products composition are indicated by the appearance, in case of a direct polarity of the ionistor connection, of a new absorption maximum in the region of 360 nm. The results may be of interest for the development of new methods of bioelectrochemical cleaning.

Keywords: bioelectrochemical system, *Shewanella oneidensis* MR-1, crystal violet, congo red, bioelectrocatalysis, decolorization, anode, microbial fuel cell