

БИОДЕГРАДАЦИЯ Н-АЛКАНОВ В НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ ПРИ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

© 2024 г. А. А. Самков^{а, *}, Н. Н. Волченко^а, Т. Н. Мусорина^а, М. Н. Круглова^а,
С. М. Самкова^а, А. А. Худокормов^а

^аФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, 350040, Россия

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Поступила в редакцию 01.09.2023 г.

После исправления 20.10.2023 г.

Принята к опубликованию 28.10.2023 г.

Для биоэлектрохимической системы безмембранного (илового) типа исследована деградация углеводородов нефти, искусственно внесенной в донные отложения. Обнаружено, что пассивная биоэлектрохимическая стимуляция посредством электродов, соединенных внешней цепью с сопротивлением 1 кОм, при среднем электрическом токе около 85 мкА, за два месяца обеспечила прирост деградации от 23.0 до 57.9%. Загрязнение донных отложений нефтью в концентрации около 1.32 г/кг незначительно снижало ток во внешней цепи биоэлектрохимической системы. Выявлена связь степени деградации нефти с преимущественной утилизацией более легких н-алканов в ряду C₁₄H₃₀–C₃₀H₆₂ по сравнению как с исходной нефтью, так и с остаточными углеводородами в контроле. Рост относительной, к гену 16s рРНК, представленности генов алканмонооксигеназ *alkB* в тотальной ДНК, выделенной из донных отложений, был в сходной мере индуцирован внесением гексадекана как при биоэлектрохимической стимуляции, так и в контроле. Результаты могут представлять интерес для разработки новых методов биоэлектрохимической очистки анаэробных сред от органических загрязнений.

Ключевые слова: биоэлектрохимическая система, микробные топливные элементы, биоэлектродокатализ, алканы, биодegradация, алканмонооксигеназа, *alkB*, нефть, биоремедиация

DOI: 10.31857/S0026365624030066

Биоэлектрохимические системы на базе микробных топливных элементов в настоящее время все более широко исследуются как инструмент экологической биотехнологии, поскольку позволяют качественно и количественно изменить катаболический потенциал микроорганизмов-деструкторов, что было подтверждено многими исследованиями (Li et al., 2015; Idris et al., 2022).

Деградация ксенобиотиков чистой культурой *Shewanella oneidensis* MR-1, исследованная в условиях микробных топливных элементов мембранного типа, показала взаимосвязь между электрической стимуляцией системы через внешнюю цепь и удельной скоростью обесцвечивания трифенилметанового красителя кристаллического фиолетового, а также составом продуктов его трансформации. Аналогичный эффект был обнаружен для азокрасителя конго красного. В качестве механизма взаимосвязи было предположено сопряжение электрохимических реакций, происходящих на аноде, и ферментативных реакций деградации красителя, благодаря высокой экзоэлектрогенной активности использованной культуры рода *Shewanella* (Самков и соавт., 2023). Микроорганизмы с экзоэлектрогенной

активностью, в том числе данного рода, часто представлены в микробиоценозах донных отложений, так как имеют приспособительные механизмы функционирования в условиях дефицита конечных акцепторов электронов, за счет эффективного восстановления внешних акцепторов (Fe³⁺ и др.) (Bose et al., 2009; Voeikova et al., 2013). Обнаружено присутствие больших титров электроактивных микроорганизмов рода *Geobacter* в микробиоценозах, осуществляющих деструкцию углеводородов в почвах (Wang et al., 2019a).

К настоящему моменту разработаны и активно используются многочисленные технологии биологической очистки углеводород-загрязненных почв и грунтов, созданы бактериальные препараты, однако эти методы основаны на использовании микроорганизмов в преимущественно аэробных или микроаэрофильных условиях. Известно, что нефть и тяжелые нефтепродукты, попадая в водоемы, в смеси со взвешенными твердыми частицами оседают на дно и становятся частью донных отложений. С учетом больших объемов нефтяных загрязнений, актуальность данной экологической проблемы очевидна. Это связано с тем, что,

достаточно интенсивно окисляясь в аэробных условиях, углеводороды нефти в донных отложениях способны гораздо дольше сохранять свои опасные свойства. Известно, что недостаток кислорода накладывает некоторые ограничения на скорость биodeградации. В условиях недостатка акцепторов электронов значительную проблему может представлять избыток восстановительных эквивалентов, образующихся при электронтранспортом фосфорилировании. Ряд исследователей поддерживает гипотезу о том, что в анаэробной среде, при наличии искусственного акцептора электронов, например, анода микробного топливного элемента, осуществляющие начальные стадии катаболизма углеводородного поллютанта бактерии способны взаимодействовать с электроактивными бактериями (Tusci et al., 2021). Высказываются гипотезы о формировании “биоэлектрохимических трубопроводов”, обеспечивающих перенос электронов на большие расстояния между бескислородными донными отложениями и богатой кислородом вышележащей водой, стимулируя разложение нефти (Marzocchi et al., 2020).

Для нужд экологической биотехнологии большой интерес представляет возможность повышения интенсивности биodeградации нефтяных углеводородов в донных отложениях путем электрохимической стимуляции. Принципиальная возможность такого усиления биodeградации показана в целом ряде исследований и обзоров. В работе Mohanakrishna et al. (2020) показано, что в биоэлектрохимической системе проточного типа в условиях добавления в нефтезагрязненный почвогрунт сточной воды и ацетата убыль общих нефтепродуктов возрастала от 503 до 525–560 мг/л соответственно. Наиболее распространенной схемой внешней цепи считается резистор 1 кОм, обеспечивающий поляризацию электрода и возможность переноса электронов на катод; при этом в работе Cabreza et al. (2021) акцентируется внимание на деградации в биоэлектрохимической системе с пластовой водой большой доли углеводородов с использованием сульфатов в качестве конечного акцептора, альтернативного аноду. В ряде работ упоминается о роли дополнительных проводящих материалов в анодной зоне, как влияющих на межвидовой перенос электронов. При использовании активированного угля упоминается увеличение биodeградации пентахлорфенола в присутствии представителей *Desulfitobacterium* и *Geobacter* (Wang et al., 2021), либо интенсификация (при размещении углеродного войлока в анаэробном реакторе) синтрофии между гомоацетогенными бактериями *Tepidanaerobacter* и *DeFluviitoga*, способными к прямой передаче электрона, и метаногенами, прежде всего, *Methanotherix* (Zhuravleva et al., 2023). В обзоре Lan et al. (2023) показаны многочисленные примеры прироста деградации нефти, дизельного топлива, моторного масла в простых почвенных

биоэлектрохимических системах на десятки процентов, при начальной концентрации в десятки г/кг. Таким образом, интенсификация катаболизма микробного сообщества в условиях, приближенных к анаэробным, происходит как за счет вывода электрона через внешнюю цепь, так и за счет перераспределения электронов между членами сообщества, разделенными пространственно, через инертный проводник и способность микроорганизмов к прямому транспорту электронов на него.

Несмотря на значительно более широкую распространенность алканмонооксигеназ, использующих молекулярный кислород в аэробной среде, гены *alkB* распространены также и в донных отложениях, где происходит биodeградация углеводородов (Wasmund et al., 2009; Paisse et al., 2011). В работе Venkidusamy et al. (2016) биопленки, формирующиеся на аноде биоэлектрохимической системы, где происходила биodeградация дизельного топлива, демонстрировали нарастание генов алканмонооксигеназ, в том числе *alkB*. При этом результаты секвенирования продуктов ПЦР с праймерами к генам *alkB* из образцов длительно функционировавшего в биоэлектрохимической системе анода показали большое сходство с последовательностями *alkB* у известных экзoeлектрогенов *Rhodopseudomonas*, *Shewanella* и *Stenotrophomonas*, а также сульфатредукторов *Catenulispora*, *Patulibacter*, *Marinobacter*, в то время как на ранних стадиях доминировали актинобактерии. Авторы исследования предположили, что произошел отбор экзoeлектрогенных бактерий, разлагающих дизельное топливо (Venkidusamy et al., 2016). Таким образом, возможность экзoeлектрогенных микроорганизмов деградировать алканы в условиях недостатка конечных акцепторов компенсировалось использованием анода для вывода электронов.

Известно, что анаэробная деградация углеводородов, в частности, алканов, предполагает начальную активацию молекулы несколькими путями, в конечном итоге ведущим к образованию карбоновой кислоты, а именно присоединением алкилсукцинатсинтазой к углеводородной цепи сукцината, образующегося через восстановление фумарата, либо присоединением к третьему углеродному атому цепи карбоксильной группы от неорганического донора, либо иными путями, сопряженными с нитратредукцией, сульфатредукцией или дисмутацией хлорит-аниона ClO_2^- с выделением молекулярного кислорода. Сопряжение анаэробной деградации алканов с метаногенезом обеспечивается ассоциативными с метаногенами синтрофными бактериями, трансформирующими алканы до ацетата и водорода, предположительно, с использованием неорганических доноров кислорода; при этом в качестве акцептора электронов выступает протон (Mbadinga et al., 2011). Образующиеся жирные

кислоты, в зависимости от наличия акцепторов, могут утилизироваться как через бета-окисление, так и через классическую анаэробную трофическую цепь, с выделением метана и углекислоты. Таким образом, наличие в среде искусственного акцептора электронов их электропроводящего материала может оказывать влияние как на удаление из среды избытка электронов через внешнюю цепь, так и через интенсификацию синтрофных взаимодействий между гомоацетогенами и метаногенами (Zhuravleva et al., 2023). В работе Liang et al. (2023) было обнаружено, что микробные консорциумы из гидротермальных отложений в различных регионах бассейна Гуаймас способны к сопряженному с сульфатредукцией анаэробному биологическому разложению n -алканов C_6 – C_{12} и C_{16} – C_{18} , а также сырой нефти. При этом в сообществе доминировали гены, ответственные за активацию через сукцинат алканов и аренов алкилсукцинатсинтазой и бензилсукцинатсинтазой соответственно (Liang et al., 2023). Таким образом, для оценки возможности биоэлектрохимической стимуляции деградации углеводородов в условиях донных отложений важно понимание баланса между классическим путем, за счет монооксигеназ, и альтернативными, не связанными с *alkB*.

Было предположено, что разница между начальными путями катаболизма алканов через прямое окисление монооксигеназами (алкангидроксилазной системы) и альтернативными вариантами анаэробного катаболизма проявится через разницу спектра остаточных углеводородов, а сравнение степени деструкции нефти с относительной представленностью генов *alkB* позволит сделать вывод о возможном вкладе монооксигеназного пути в процесс в условиях донных отложений.

Целью настоящей работы было изучение влияния условий безмембранной биоэлектрохимической системы с разностью потенциалов между электродами, обусловленной естественными процессами в донных отложениях, на биodeградацию нефти и качественный состав остаточных n -алканов, а также на относительную представленность копий генов бактериальных алканмоноксигеназ *alkB*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы. Нефтеоокисляющий штамм *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д (Самков и соавт., 2015), ранее выделенный и поддерживаемый на кафедре генетики, микробиологии и биохимии, был использован для валидации результатов количественной ПЦР.

Условия биоэлектрохимической стимуляции. В качестве биоэлектрохимической системы использовали безмембранные (иловые) микробные топливные элементы, представляющие собой анод

и катод, размещенные в донных отложениях (иле из озера Карасунское (г. Краснодар); координаты 45.022208, 39.034746) и в слое воды над ним, соответственно, соединенные внешней электрической цепью. Ил находился в емкостях диаметром 30 см слоем 6 см, в 1 см от дна размещали квадратный анод со стороной 8 см, изготовленный из углеродного войлока НТМ-100М. Над донными отложениями в зоне проекции анода на поверхность воды, налитой слоем 5 см, был размещен катод аналогичного размера и материала. Электрические провода от анода и катода были соединены через резистор сопротивлением 1 кОм. В донные отложения предварительно вносили нефть российскую в количестве 0.625 г на 1 л ила естественной влажности, что соответствовало концентрации 1.32 г/кг сухого ила. Использовали малосернистую (0.434%) нефть, фракционный состав которой приведен на рис 2а. В контрольном образце, в нефтезагрязненных донных отложениях, электроды не размещали. Также был подготовлен вариант с электродами, но без внесения нефти. Отдельную линию аналогичных экспериментов делали с внесением в донные отложения вместо нефти n -гексадекана либо нафталина в концентрации 0.3 г/л. Измерение разности потенциалов выполняли при помощи прецизионного цифрового мультиметра Актаком АММ-1139 (“НПП Эликс”, Россия). Ток вычисляли по закону Ома для участка цепи, с учетом сопротивления.

Измерение окислительно-восстановительного потенциала. Окислительно-восстановительный потенциал в донных отложениях контролировали при помощи рН-метра/ОВП-метра Hanna HI8424 с ОВП-электродом HI3230.

Количественный анализ нефтепродуктов. Определение концентрации остаточных нефтепродуктов проводили флуоресцентным методом на приборе Флюорат-02 (“Люмэкс”, Россия). Хлороформный экстракт из воздушно-сухого образца перерастворяли в гексане и очищали на колонке с оксидом алюминия перед измерением.

Хроматографический анализ. Оценку состава остаточных углеводородов проводили методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ/ПИД) на хроматографе Shimadzu GC2010 (Япония) с кварцевой капиллярной колонкой Quadrex длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщина фазы Silphenylene polysiloxane – 0.25 мкм.

Молекулярно-генетические анализы. 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), с вариантом ручной пробоподготовки с жидким азотом.

Аmplификацию с детекцией в реальном времени проводили на Rotor-Gene Q (“QIAGEN GmbH”, Германия), используя набор реагентов R-402 для

проведения рвПЦР в присутствии SYBRGreen I (ООО “НПФ Синтол”, Россия). Использовали универсальные олигонуклеотидные праймеры к гену 16s рРНК (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG и 805R5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT), а также вырожденные праймеры к генам бактериальных алканмонооксигеназ *alkB* F 5'-AACTACMTTCGARCAYTACGG и *alkB* R5'-TGAMGATGTGGTYRCTGTTCC (Powell et al., 2006). Относительную представленность генов алканмонооксигеназы вычисляли как отношение предварительно полученных показателей эффективности ПЦР с праймерами для гена 16s рРНК к таковой величине для гена *alkB*, в степенях соответствующих значений циклов количественной оценки *Cq* для референсного и целевого генов (Yuan et al., 2006; Bustin et al., 2009). Для построения стандартной кривой и определения эффективности ПЦР с праймерами для генов 16s рРНК и *alkB* в качестве контроля использовали штамм *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д, содержащий оба указанных гена.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биоэлектрохимическая стимуляция деградации обеспечивалась размещением в донных отложениях анода, соединенного электрической цепью сопротивлением 1 кОм с расположенным на поверхности воды катодом. Разность потенциалов между электродами такой системы, в режиме разомкнутой цепи, составляла 0.94 В и была связана с естественной поляризацией, теоретически способной достигать величины около 1.105 В. Размещение в цепи резистора обеспечивало замыкание внешней цепи и перемещение электронов от анода к катоду, а также возможность учета количества генерируемого электричества для оценки, в том числе, токсического воздействия нефти на микробиоценоз. Величина окислительно-восстановительного потенциала в околоанодной зоне биоэлектрохимической системы и аналогичном горизонте донных отложений в контроле была сходна и варьировалась около величины -289.7 мВ.

Динамика электрического тока во внешней цепи биоэлектрохимических систем (БЭС), различающихся присутствием и отсутствием нефтяного загрязнения донных отложений, показала некоторое ингибирование электрогенеза данной концентрацией загрязнителя (рис. 1), при которой показатель стабилизировался на величине более 100 мкА, что практически в два раза меньше контроля.

При этом, в течение первых 20 сут эксперимента, углеводороды не оказывали негативного влияния.

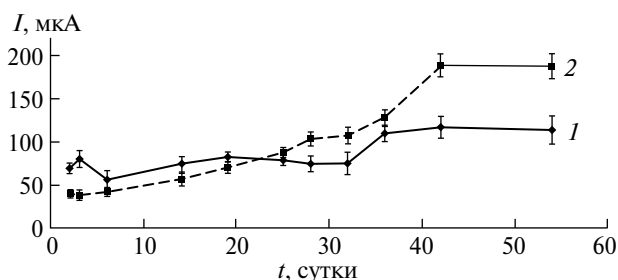


Рис. 1. Электрический ток во внешней цепи биоэлектрохимической системы в зависимости от наличия (1) или отсутствия (2) нефтяного загрязнения.

Снижение электрогенеза, предположительно, могло быть вызвано изменением микробиоценоза донных отложений, ведущим к уменьшению поступления электронов на анод, с задействованием иных конечных акцепторов. В работах со сходными условиями экспериментов обнаруживаются примеры преимущественно негативного (при высоких концентрациях порядка граммов на литр) влияния углеводородов на электрогенез. Например, в работе Chandrasekhar, Venkata Mohan (2012) в режиме разомкнутой цепи наблюдались следующие сочетания концентрации общих нефтяных углеводородов в шлам и напряжения: 1.11 г/л — 356 мВ, 3.34 г/л — 304 мВ, 5.56 г/л — 180 мВ и 11.10 г/л — 140 мВ. При этом максимальная убыль углеводородов наблюдалась именно в варианте с наименьшим электрогенезом (Chandrasekhar, Venkata Mohan, 2012).

После двух месяцев эксперимента был проведен отбор проб нефтезагрязненных донных отложений из приэлектродных зон опытных устройств, а также контрольных. Приэлектродной зоной считали ил между анодом, размещенным на дне сосуда на глубине около 6 см, и катодом. Отбор проб производили с глубины 1–4 см от дна. В контролях отбирали аналогичный по глубине слой донных отложений. Исследование концентрации остаточных углеводородов в донных отложениях показало значительную стимуляцию биodeградации в приэлектродной зоне. Степень деградации исходно внесенной нефти составила 57.9%. В то же время в контроле она составляла 23.0%.

Хроматографический анализ исходной сырой нефти и остаточных углеводородов показал значительные различия соотношения различных индивидуальных н-алканов в образцах из биоэлектрохимической системы и контроля. Сравнение хроматограмм нефтепродуктов приведено на рис. 2.

Разница в соотношении площадей пиков индивидуальных углеводородов, различающихся длиной цепи, для приведенного варианта опытного образца и контроля демонстрировала выраженную тенденцию к убыли, в случае пробы из зоны наиболее активной биоэлектрохимической деградации, преимущественно легких фракций н-алканов (в районе $C_{14}H_{30}$ и выше) при сохранении тяжелых.

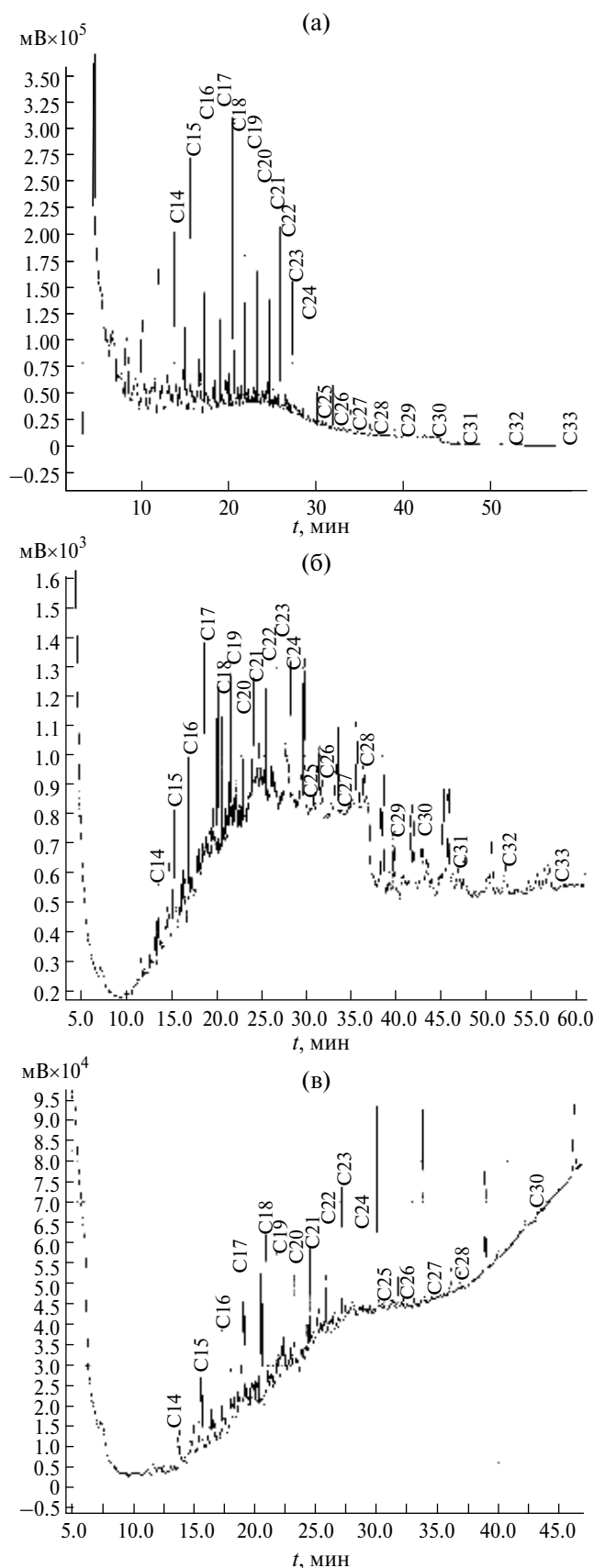


Рис. 2. Хроматограммы исходной сырой нефти (а), остаточных углеводородов в контроле (б) и биоэлектрохимической системе (в).

Для изучения характера влияния условий биоэлектрохимической системы на качественные параметры деструкции было проведено сравнение с исходной нефтью состава остаточных н-алканов, в диапазоне от $\text{C}_{14}\text{H}_{30}$ до $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$ включительно. Для всех образцов были определены и сопоставлены площади соответствующих пиков хроматограмм. Приведенные в виде долей единицы значения показаны на рис. 3, для демонстрации баланса индивидуальных углеводородов на каждом графике приведены линии трендов. Процентные доли гомологов приведены в табл. 1.

Исходная сырая нефть, использованная для внесения в донные отложения (рис. 3а), продемонстрировала значительное преобладание легких гомологов н-алканов с постепенным практически линейным убыванием до $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$. Остаточные углеводороды, после двухмесячной деградации без

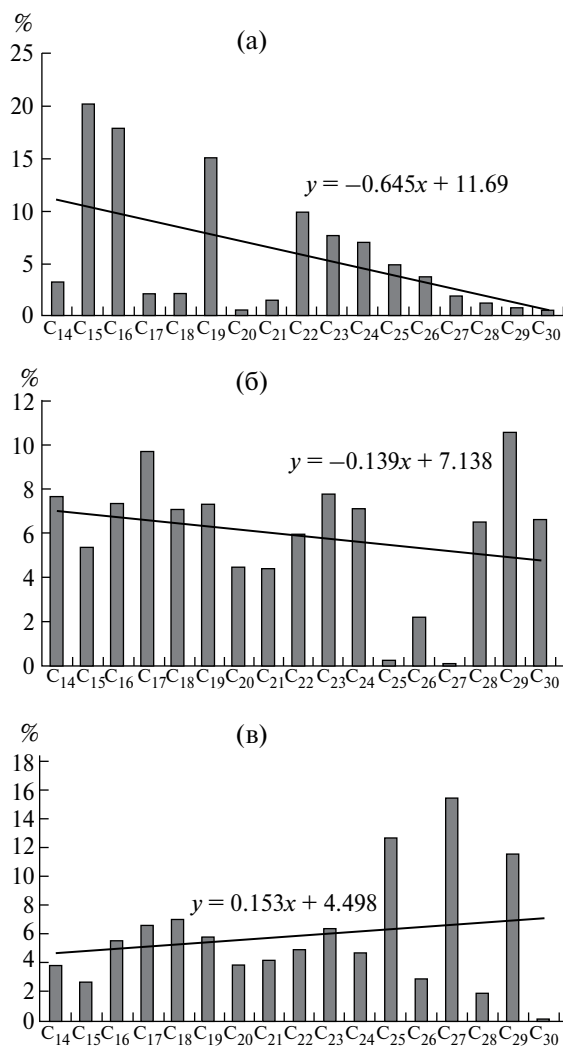


Рис. 3. Процентные доли площадей пиков н-алканов $\text{C}_{14}\text{H}_{30}$ – $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$ в зависимости от наличия биоэлектрохимического воздействия: а – нефть сырая; б – контроль; в – опыт.

Таблица 1. Процентное соотношение н-алканов $C_{14}H_{30}$ – $C_{30}H_{62}$

Гомолог	Нефть сырая	Биоэлектрохимическая система	Контроль
$C_{14}H_{30}$	3.22	3.79	7.62
$C_{15}H_{32}$	20.20	2.66	5.32
$C_{16}H_{34}$	17.86	5.55	7.34
$C_{17}H_{36}$	2.09	6.63	9.66
$C_{18}H_{38}$	2.11	7.04	7.06
$C_{19}H_{40}$	14.98	5.79	7.30
$C_{20}H_{42}$	0.56	3.89	4.44
$C_{21}H_{44}$	1.51	4.16	4.38
$C_{22}H_{46}$	9.86	4.90	5.94
$C_{23}H_{48}$	7.65	6.34	7.74
$C_{24}H_{50}$	7.02	4.70	7.08
$C_{25}H_{52}$	4.86	12.67	0.26
$C_{26}H_{54}$	3.72	2.92	2.19
$C_{27}H_{56}$	1.7	15.43	0.08
$C_{28}H_{58}$	1.20	1.90	6.47
$C_{29}H_{60}$	0.78	11.55	10.52
$C_{30}H_{60}$	0.52	0.08	6.58

биоэлектрохимической стимуляции в контроле (рис. 3б), имели уже более сходную представленность практически всех гомологов относительно таковых в исходной нефти, что может быть объяснено более высокой биологической доступностью и, соответственно, интенсивной деградацией легких соединений исследованного диапазона при сохранении более тяжелых алканов. Образцы из биоэлектрохимически активной приэлектродной зоны микробного топливного элемента отличались балансом остаточных фракций, уже заметно смещенным в сторону преобладания более длинноцепочечных углеводородов, что хорошо иллюстрируется противоположным наклоном линий тренда (рис. 3в) по сравнению с контролем (рис. 3б). Баланс гомологов также иллюстрируется знаками при коэффициентах наклонов уравниваний линий трендов, отрицательных в случае сырой нефти, контроля и положительных в биоэлектрохимически активной приэлектродной зоне.

Таким образом, обнаружена биоэлектрохимическая стимуляция деградации углеводородов в микробном топливном элементе на основе донных отложений, что проявилось в почти двукратном увеличении убыли тотальных углеводородов, а также в преимущественном разложении более легких, биологически более доступных фракций н-алканов.

Было предположено, что в биоэлектрохимической системе стимуляция деградации легких фракций алканов могла быть связана либо с количественным ростом деградирующих углеводород

ферментных систем или ростом титра деструкторов, либо с качественным изменением протекания процессов катаболизма в микробном сообществе. В частности, с вовлечением в биodeградацию других микроорганизмов и ферментных систем, при отсутствии в донных отложениях электропроводящего анода и внешней цепи не проявляющихся. Например, анаэробных путей, связанных с сульфатредукцией, метаногенезом, восстановлением фумарата и др. (Mbadinga et al., 2011; Liang et al., 2023).

Известно, что ключевым ферментом бактериального окисления алканов является алкан-1-монооксигеназа (Bukliarevicha et al., 2023); *alkB* – хорошо изученная ферментная система терминального гидроксирования алканов, катализирующая начальную стадию окисления углеродной цепи, а именно окисление метильной или метиленовой групп (Хмелевцова и соавт., 2017). Исследования показали широкую распространенность гена *alkB* и его гомологов в микробиоценозах, члены которых участвуют в начальных стадиях разложения алканов (Соляникова, Головлёва., 2019; Турова и соавт., 2018). Известны упоминания связи экспрессии генов деградации, в частности *alkB*, величин биodeградации углеводородов и электрохимических условий (Tao et al., 2023; Venkidusamy et al., 2016; Wang et al., 2019b).

Предварительно при помощи ПЦР в реальном времени и вырожденных праймеров, выявляющих гомологи гена алканмонооксигеназы у представителей разных филумов, в том числе *Proteobacteria*

(Powell et al., 2006), было обнаружено, что в тотальной ДНК, выделяемой из использованных в эксперименте донных отложений, стабильно присутствуют гены группы *alkB*.

Для оценки влияния биоэлектростимуляции на относительную представленность (Taylor et al., 2010) генов, ответственных за начальные стадии деградации алканов, был проведен аналогичный эксперимент, где в донные отложения были искусственно внесены типичные индивидуальные алифатические и ароматические углеводороды, присутствующие в нефти: н-гексадекан и нафталин. С использованием вырожденных праймеров (Powell et al., 2006) в тотальной ДНК, выделенной из донных отложений после двухмесячной инкубации, оценивали относительную представленность (относительное число копий) гена *alkB*, используя в качестве гена сравнения 16S рРНК (рис. 4).

Использованный метод вычисления отношения величин эффективностей ПЦР гена сравнения и целевого гена, в степенях циклов количественной оценки, в настоящее время используется все более широко (Shvets et al., 2022). Предварительно для каждой пары праймеров и матрицы, в качестве которой использовали ДНК из тест-культуры *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д, были получены кривые зависимости цикла количественной оценки от десятичного логарифма числа копий ДНК-матрицы. Для праймеров к 16S рРНК эффективность составила 1.92, для *alkB* – 1.87, что находится в оптимальном для ПЦР диапазоне, равном 1.8–2.2 (Taylor et al., 2010).

Прирост показателя по отношению к контролю (донные отложения без поллютанта) в наибольшей степени обеспечивался внесением гексадекана, внесение же нафталена достоверно не меняло относительную представленность гомологов алканомоноксигеназы, не превышавшую значение 3.0. При внесении гексадекана биоэлектростимуляция обеспечивала незначительный прирост показателя с 5.9 до 6.6. Катаболический путь, связанный с *alkB*, по данным ряда авторов, также связан с деградацией углеводородов в условиях, приближенных к анаэробным (Wasmund et al., 2009; Paise et al., 2011), но в данных экспериментальных условиях электрическая стимуляция обеспечивала значительную повышенную деструкцию нефти без выраженного увеличения в сходной степени представленности данного гена в тотальной ДНК микробиома. Таким образом, имел место иной механизм стимуляции. Известно, что система *alkB* нуждается в различных, связанных с цитохромами кофакторах, обеспечивающих изменение степени окисления углеродного атома. Бактериальные цитохромы обладают монооксигеназной активностью в отношении различных органических низкомолекулярных субстратов, при этом также нуждаясь

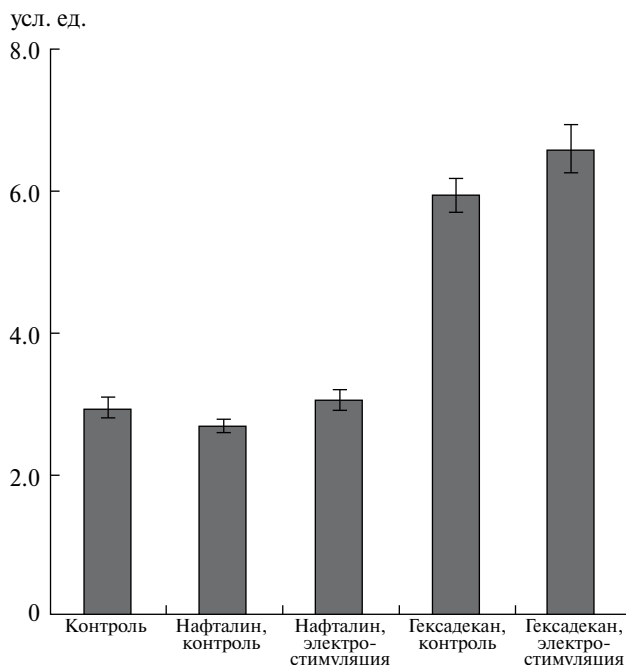


Рис. 4. Относительная представленность генов *alkB* в зависимости от вносимого углеводорода и наличия биоэлектростимуляции.

в электронах от сторонних доноров. Известно, что цитохромы P450 могут катализировать монооксигеназные реакции при отсутствии молекулярного кислорода, но при условии наличия органических или неорганических пероксидов (Хмелевцова и соавт., 2017). Отсутствие прироста относительной представленности генов алканомоноксигеназы *alkB* при увеличении фактической деструкции углеводородов могло свидетельствовать, в том числе об использовании микроорганизмами-деструкторами альтернативных ферментов. Например, цитохром-оксидазы CYP153-гидроксилазы, обычной для деструкторов алканов, у которых отсутствуют *alkB* (Хмелевцова и соавт., 2017).

Важнейшей особенностью биоэлектростимуляционной системы является формирование потока электронов на анод, выполняющий функцию искусственного акцептора электронов, и протонов на катод, что решает проблему регенерации окисленных форм внутриклеточных окислительно-восстановительных эквивалентов, задействованных в энергетическом метаболизме прокариот. В природных анаэробных микробиоценозах межвидовой перенос электронов расширяет жизненные возможности синтрофными связями членов сообществ (Ножевникова и соавт., 2020). Известно, что микробиоценозы анодных зон биоэлектростимуляционных систем способны к межклеточному переносу электронов, как контактному (непосредственному), через клеточные стенки или обладающие металлической электропроводимостью пили IV типа (Lovley et al., 2017), так и опосредованному различными

внеклеточными медиаторами (Prathiba et al., 2022). Связь биодegradации нефти в анаэробных или микроаэрофильных условиях, в переувлажненных почвах и донных осадках, с наличием неорганических акцепторов электронов, диспергированных в среде (Водяницкий и соавт., 2015), согласуется с концепцией формирующихся в биоэлектрохимических системах “биоэлектрохимических трубопроводов”, обеспечивающих межвидовой перенос электронов на большие расстояния, стимулируя энергетический метаболизм электрон-транспортного типа (Marzocchi et al., 2020). Повышенная активность бактериальных окислительно-восстановительных систем, связанных с деградацией углеводов, в условиях биоэлектрохимической стимуляции может быть связана с формированием в приближенной к аноду и расположенной в межэлектродном пространстве области пула восстановленных и окисленных микробных медиаторов, а также клеточных структур, передающих электроны на искусственный акцептор — анод.

Полученные данные об отсутствии прямой связи между уровнем представленности *alkB* и степенью биодegradации углеводов согласуются с результатами Paise et al. (2011), показавшими, что гены *alkB*, исходно присутствовавшие в микрофлоре донных отложений, их экспрессия и относительная копияность хотя и реагировали ростом на искусственное внесение поллютанта без использования биоэлектрохимических условий, не были связаны строго функционально с биодegradацией (Paise et al., 2011). Можно сделать вывод о том, что значительный вклад в наблюдающееся усиление деградации углеводов играют анаэробные пути разложения алканов, сопряженные на более поздних этапах с классической анаэробной трофической цепью углерода. Поскольку она предполагает вывод из системы избыточных восстановительных эквивалентов, в конечном итоге посредством метаногенеза с выделением в атмосферу метана и CO_2 , то роль внешней электрической цепи биоэлектрохимической системы, отводящей электроны, в случае углеводородного загрязнения — вторична, и основным фактором является наличие в иле электропроводящей матрицы, интенсифицирующей синтрофные взаимодействия (Zhuravleva et al., 2023).

Таким образом, экспериментально подтверждено увеличение деструкции углеводов нефти в условиях искусственно загрязненных анаэробных донных отложений при биоэлектрохимической стимуляции — наблюдалось увеличение деструкции до 57.9%. Хроматографический анализ остаточных углеводов, в частности, н-алканов $\text{C}_{14}\text{H}_{30}$ — $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$, показал разницу в соотношении гомологов с разными длинами цепей, при этом повышенная деструкционная активность, за счет биоэлектрохимической стимуляции, была связана с преимущественной убылью более легких

соединений. Обнаружено, что внесение в донные отложения н-гексадекана, в отличие от нафталина, увеличивало относительную представленность бактериальных алканомоноксигеназ *alkB*, однако в данных экспериментальных условиях биоэлектрохимическая стимуляция не оказывала значительного влияния, способного объяснить прирост деструкции. Предположено, что формирование в межэлектродном пространстве системы дальнего переноса электронов, выражавшейся в протекании через внешнюю цепь стабильного электрического тока величиной около 80–100 мкА, могло оказывать влияние на работу цитохромных систем микроорганизмов-деструкторов, опосредующих начальные реакции окисления алканов. После исчерпания в системе кислорода и иных конечных акцепторов, присутствовавших там на начальных этапах эксперимента, на поверхности электропроводящего анода с развитой поверхностью могло происходить формирование синтрофных ассоциаций, имеющих преимущество в катаболической активности по сравнению с контролем, за счет возможности обмена электронами через прямой транспорт электронов на проводник и обратно (Zhuravleva et al., 2023). Известно, что классической анодной полуреакцией, обеспечивающей протекание тока во внешней цепи, является разложение органического субстрата и передача на анод электрона, с переносом на катод, а также образование протонов, диффундирующих к катоду, где с привлечением O_2 происходит образование воды. Внесение в донные отложения дополнительного источника углерода и энергии в виде нефти не сопровождалось ростом продуцируемого системой электричества, что видно из сравнения площадей под кривыми зависимости электрического тока от времени опыта и контроля. С учетом параллельного увеличения деградации можно сделать вывод, что выход электронов из бескислородной зоны мог происходить не только через внешнюю цепь биоэлектрохимической системы, но и альтернативными путями, например, за счет активизации передачи электронов между членами анаэробной трофической цепи углерода с образованием газообразных продуктов, покидающих систему: анаэробное окисление алканов с образованием алкилсукцинатов, высших жирных кислот и спиртов, последующие брожения с образованием бутирата, пропионата, ацетата, формата и т.п., гомоацетогенез и синтрофное окисление ацетата, метаногенез с выделением метана и CO_2 (Mbadinga et al., 2011; Ножевникова и соавт., 2020).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Хроматографические исследования выполнены в Центре коллективных исследований “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

Авторы благодарят проф. Э. В. Карасеву за любезное предоставление штамма *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Водяницкий Ю. Н., Трофимов С. Я., Шоба С. А. Влияние Fe (III) на биodeградацию нефти в переувлажненных почвах и осадках // Почвоведение. 2015. № 7. С. 877–886.
- Vodyanitskii Y. N., Trofimov S. Y., Shoba S. A. The influence of Fe (III) on oil biodegradation in excessively moistened soils and sediments // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. P. 764–772.
- Ножевникова А. Н., Русскова Ю. И., Литти Ю. В., Паришина С. Н., Журавлева Е. А., Никитина А. А. Синтрофия и межвидовой перенос электронов в метаногенных микробных сообществах // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 131–151.
- Nozhevnikova A. N., Russkova Y. I., Litti Y. V., Parshina S. N., Zhuravleva E. A., Nikitina A. A. Syntrophy and interspecies electron transfer in methanogenic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 129–147.
- Самков А. А., Джимаков С. С., Барышев М. Г., Волченко Н. Н., Худокормов А. А., Самкова С. М., Карасева Э. В. Влияние изотопного состава воды на продукцию биомассы *Rhodococcus erythropolis* // Биофизика. 2015. Т. 60. С. 136–142.
- Samkov A. A., Dzhimak S. S., Barishev M. G., Volchenko N. N., Khudokormov A. A., Samkova S. M., Karaseva E. V. The effect of water isotopic composition on *Rhodococcus erythropolis* biomass production // Biophysics. 2015. V. 60. P. 107–112.
- Самков А. А., Чугунова Ю. А., Круглова М. Н., Моисеева Е. В., Волченко Н. Н., Худокормов А. А., Самкова С. М., Карасева Э. В. Обесцвечивание красителей в биоэлектрохимической системе при иммобилизации клеток *Shewanella oneidensis* MR-1 на поверхности анода и электрической стимуляции внешней цепи // Прикл. биохимия и микробиология. 2023. Т. 59. С. 191–199.
- Samkov A. A., Chugunova Yu. A., Kruglova M. N., Moiseeva E. V., Volchenko N. N., Khudokormov A. A., Samkova S. M., Karaseva E. V. Decolorization of dyes in a bio-electrochemical system depending on the immobilization of *Shewanella oneidensis* MR-1 cells on the anode surface and electrical stimulation of an external circuit // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. P. 198–205.
- Соляникова И. П., Головлёва Л. А. Гексадекан и бактерии-деструкторы: механизмы взаимодействия // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 19–31.
- Solyanikova I. P., Golovleva L. A. Hexadecane and hexadecane-degrading bacteria: mechanisms of interaction // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 15–26.
- Турова Т. П., Соколова Д. Ш., Семенова Е. М., Полтараус А. Б., Назина Т. Н. Разнообразие генов биodeградации n-алканов *AlkB* у термофильных углеводородокисляющих бактерий родов *Geobacillus*, *Parageobacillus* и *Aeribacillus* // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 225–232.
- Tourova T. P., Sokolova D. Sh., Semenova E. M., Poltarau A. B., Nazina T. N. Diversity of the *AlkB* genes of n-alkane biodegradation in thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria of the *Geobacillus*, *Parageobacillus*, and *Aeribacillus* // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 301–307.
- Хмелевцова Л. Е., Сазыкин И. С., Сазыкина М. А., Селиверстова Е. Ю. Цитохромы P450 прокариот (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. С. 363–372.
- Khmelevtsova L. E., Sazykin I. S., Sazykina M. A., Seliverstova E. Y. Prokaryotic cytochromes P450 (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. P. 401–409.
- Bose S., Hochell M. F. Jr., Gorby Y. A., Kennedy D. W., McCready D. E., Madden A. S., Lower B. H. Bioreduction of hematite nanoparticles by the dissimilatory iron reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1 // Geochim. Cosmochim. Acta 2009. V. 73. I. 4. P. 962–976.
- Bukliarevich H. A., Gurinovich A. S., Filonov A. E., Titok M. A. Molecular genetic and functional analysis of the genes encoding alkane 1-monooxygenase synthesis in members of the genus *Rhodococcus* // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 242–255.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Wittwer C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments // Clin. Chem. 2009. V. 55. P. 611–622.
- Cabrera J., Irfan M., Dai Y., Zhang P., Zong Y., Liu X. Bioelectrochemical system as an innovative technology for treatment of produced water from oil and gas industry — a review // Chemosphere. 2021. V. 285. Art. 131428.
- Chandrasekhar K., Venkata Mohan S. Bio-electrochemical remediation of real field petroleum sludge as an electron donor with simultaneous power generation facilitates biotransformation of PAH: effect of substrate concentration // Bioresour. Technol. 2012. V. 110. P. 517–525.

- Idris M. O., Kim H.-C., Yaqoob A. A., Ibrahim M. N. M.* Exploring the effectiveness of microbial fuel cell for the degradation of organic pollutants coupled with bio-energy generation // *Sustain. Energy Technol. Assess.* 2022. V. 52. Art. 102183.
- Kondaveeti S., Govindarajan D., Mohanakrishna G., Thatikayala D., Abu-Reesh I.M., Min B., Nambi I. M., Al-Raoush R.I., Aminabhavi T. M.* Sustainable bioelectrochemical systems for bioenergy generation via waste treatment from petroleum industries // *Fuel*. 2023. V. 331. Art. 125632.
- Lan J., Wen F., Ren Y., Liu G., Jiang Y., Wang Z., Zhu X.* An overview of bioelectrokinetic and bioelectrochemical remediation of petroleum-contaminated soils // *Environ. Sci. Technol.* 2023. V. 16. Art. 100278.
- Li W.-W., Yu H.-Q.* Stimulating sediment bioremediation with benthic microbial fuel cells // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 1–12.
- Liang R., Davidova I. A., Teske A., Suflita J. M.* Evidence for the anaerobic biodegradation of higher molecular weight hydrocarbons in the Guaymas Basin // *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2023. V. 181. Art. 105621.
- Lovley D. R.* Electrically conductive pili – biological function and potential applications in electronics // *Curr. Opin. Electrochem.* 2017. V. 4. P. 190–198.
- Marzocchi U., Palma E., Rossetti S., Aulenta F., Scoma A.* Parallel artificial and biological electric circuits power petroleum decontamination – the case of snorkel and cable bacteria // *Water Res.* 2020. V. 173. Art. 115520.
- Mbadinga S. M., Wang L.-Y., Zhou L., Liu J.-F., Gu J.-D., Mu B.-Z.* Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes // *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2011. V. 65. P. 1–13.
- Mohanakrishna G., Al-Raoush R.I., Abu-Reesh I. M.* Sewage enhanced bioelectrochemical degradation of petroleum hydrocarbons in soil environment through bioelectro-stimulation // *Biotechnol. Rep.* 2020. V. 27. Art. e00478.
- Paisse S., Duran R., Coulon F., Goni-Urriza M.* Are alkane hydroxylase genes (*alkB*) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments? // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 92. P. 835–844.
- Powell S. M., Ferguson S. H., Bowman J. P., Snape I.* Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in antarctic soil during bioremediation // *Microb. Ecol.* 2006. V. 52. P. 523–532.
- Prathiba S., Kumar P. S., Vo D.-V.N.* Recent advancements in microbial fuel cells: a review on its electron transfer mechanisms, microbial community, types of substrates and design for bio-electrochemical treatment // *Chemosphere*. 2022. V. 286. Art. 131856.
- Shvets D., Vinogradova S.* Occurrence and genetic characterization of grapevine Pinot Gris virus in Russia // *Plants*. 2022. V. 11. Art. 1061. P. 1–15.
- Tao L., Song M., Jiang G.* Enhanced depolluting capabilities of microbial bioelectrochemical systems by synthetic biology // *Synth. Syst. Biotechnol.* 2023. V. 8. P. 341–348.
- Taylor S., Wakem M., Dijkman G., Alsarraj M., Nguyen M.* A practical approach to RT-qPCR – publishing data that conform to the MIQE guidelines // *Methods*. 2010. V. 50. P. S1–S5.
- Tucci M., Viggi C. C., Núñez A. E., Schievano A., Rabaey K., Aulenta F.* Empowering electroactive microorganisms for soil remediation – challenges in the bioelectrochemical removal of petroleum hydrocarbons // *Chem. Eng. J.* 2021. V. 419. Art. 130008.
- Venkidasamy K., Megharaj M., Marzorati M., Lockington R., Naidu R.* Enhanced removal of petroleum hydrocarbons using a bioelectrochemical remediation system with pre-cultured anodes // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 539. P. 61–69.
- Voekova T. A., Emel'yanova L.K., Novikova L. M., Shuklov R. S., Sidoruk K. V., Smirnov I. A., Il'in V.K., Soldatov P. E., Tyurin-Kuz'min A. Yu., Smolenskaya T. S., Debabov V. G.* Intensification of bioelectricity generation in microbial fuel cells using *Shewanella oneidensis* MR-1 mutants with increased reducing activity // *Microbiology (Moscow)*. 2013. V. 82. P. 410–414.
- Wang H., Lu L., Mao D., Huang Z., Cui Y., Jin S., Zuo Y., Ren Z. J.* Dominance of electroactive microbiomes in bioelectrochemical remediation of hydrocarbon-contaminated soils with different textures // *Chemosphere*. 2019a. V. 235. P. 776–784.
- Wang H., Xing L., Zhang H., Gui C., Jin S., Lin H., Li Q., Cheng C.* Key factors to enhance soil remediation by bioelectrochemical systems (BESs): a review // *Chem. Eng. J.* 2021. V. 419. Art. 129600.
- Wang X., Wan G., Shi L., Gao X., Zhang X., Li X., Zhao J., Sha B., Huang Z.* Direct micro-electric stimulation alters phenanthrene-degrading metabolic activities of *Pseudomonas* sp. strain DGYH-12 in modified bioelectrochemical system // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019b. P. 31449–31462.
- Wasmund K., Burns K. A., Kurtböke D. I., Bourne D. G.* Novel alkane hydroxylase gene (*alkB*) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 7391–7398.
- Yuan J. S., Reed A., Chen F., Stewart Jr C. N.* Statistical analysis of real-time PCR data // *BMC Bioinform.* 2006. V. 7. Art. 85.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>
- Zhuravleva E., Kovalev A., Kovalev D., Kotova I., Shekhurdina S., Laikova A., Krasnovsky A., Pygamonov T., Vivekanand V., Li L., He C., Litti Y.* Does carbon cloth really improve thermophilic anaerobic digestion performance on a larger scale? Focusing on statistical analysis and microbial community dynamics // *J. Environ. Manage.* 2023. V. 341. Art. 118124.

Biodegradation of *n*-Alkanes in Oil-Contaminated Bottom Sediments under Bioelectrochemical Stimulation

A. A. Samkov^{1,*}, N. N. Volchenko¹, T. N. Musorina¹, M. N. Kruglova¹, S. M. Samkova¹,
and A. A. Khudokormov¹

¹Kuban State University, Krasnodar, 350040 Russia

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Received September 1, 2023; revised October 20, 2023; accepted October 28, 2023

Abstract—Degradation of oil hydrocarbons artificially introduced into bottom sediments in a bioelectrochemical system of a membrane-free (silt) type was studied. Passive bioelectrochemical stimulation by means of electrodes connected by an external circuit with a resistance of 1 kΩ, with an average electric current of ~85 μA was found to cause an increase in degradation during two months from 23.0 to 57.9%. Contamination of bottom sediments with oil (1.32 g/kg) slightly decreased the current in the external circuit of the bioelectrochemical system. The relationship was revealed between the degree of oil degradation and predominant utilization of the lighter *n*-alkanes in the C₁₄H₃₀–C₃₀H₆₂ series, compared with both the original oil and the residual hydrocarbons of the control. An increase in the representation of the *alkB* alkane monooxygenase genes relative to the 16S rRNA gene in the total DNA isolated from the sediments was induced by the introduction of hexadecane, both in the case of electrochemical stimulation and in the control. The results may be of interest for the development of new methods of bioelectrochemical removal of organic pollutants from anaerobic environments.

Keywords: bioelectrochemical system, microbial fuel cell, bioelectrocatalysis, bottom sediments, alkanes, biodegradation, alkane monooxygenase, *alkB*, oil, bioremediation