

УДК543.55

ИЗУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОГЕННОСТИ ИЗОЛЯТА *RHODOCOCCUS ELECTRODIPHILUS* С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА

*К.В. Ревякина*¹, *С.Е. Тарасов*², *Ю.В. Плеханова*², *А.Г. Быков*², *Г.В. Хохлова*²,
*М. Б. Вайнштейн*², *А.Н. Решетилов*²

¹ Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Самара, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушчино, Россия

В статье рассмотрены электрохимические особенности поведения изолята грамположительного микроорганизма *Rhodococcus electrodiphilus* при его иммобилизации на графитовом печатном электроде. Данный микроорганизм был использован как биокатализатор амперометрического биосенсора, изучена возможность и условия передачи электронов от данных микроорганизмов на электрод в процессе трансформации различных субстратов. Показано влияние иммобилизующих полимерных гелей и углеродных наноматериалов на активность данного микроорганизма и возможность его долговременной работы в составе биосенсора. Оценены перспективы использования *R. electrodiphilus* в качестве биокатализатора биосенсора для детекции глюкозы, а также 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Ключевые слова: *Rhodococcus electrodiphilus*, электрогенность, микробный биосенсор, электрохимические свойства, биокатализатор

EVALUATION OF THE ELECTROGENICITY OF *RHODOCOCCUS ELECTRODIPHILUS* ISOLATE USING AN ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR

*K.V. Revyakina*¹, *S.E. Tarasov*², *Y.V. Plekhanova*², *A.G. Bykov*², *G.V. Khokhlova*²,
*M. B. Wainshtein*², *A.N. Reshetilov*²

¹ S.P. Korolev Samara National Research University, Samara, Russia

² G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center "Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences" Pushchino, Russia

The paper discusses the electrochemical behavior of an isolate of Gram-positive microorganism *Rhodococcus electrodiphilus* upon its immobilization on a graphite screen-printed electrode. This microorganism was used as a biocatalyst for an amperometric biosensor, the possibility and conditions of electron transfer from these microorganisms to the electrode in the process of transformation of various substrates were studied. The influence of polymer gels and carbon nanomaterials on the activity of this microorganism and the possibility of its long-term operation as part of the biosensor was shown. The prospects of using *R. electrodiphilus* as a biocatalyst of biosensor for the detection of glucose and 2,6-dichlorophenolindophenol were evaluated.

Keywords: *Rhodococcus electrodiphilus*, electrogenicity, microbial biosensor, electrochemical properties, biocatalyst

Электрогенные бактерии или экзоэлектрогены – принятое название микроорганизмов, которые способны переносить электроны на внешние акцепторы [1]. Подобные микроорганизмы находят свое применение в производстве биотоплива, биоремедиации, очистке сточных вод, а также в области биосенсоров [2]. В настоящее время большое внимание исследователей направлено на то, чтобы максимизировать способность бактерий к электронному переносу и позволить масштабировать эти технологии из лабораторных масштабов до промышленного уровня. До недавнего времени область изучения внешнего электронного переноса была ограничена достаточно узким рядом электрогенных грамотрицательных бактерий, потому что считалось, что грамположительные бактерии меньше способны к электронному переносу, из-за своих более толстых и менее проводящих клеточных стенок [3]. Тем не менее в 2018 году были опубликованы работы, в которых показаны электрогенные свойства и пути внешнего электронного переноса для некоторых грамположительных бактерий, включая *Listeria monocytogenes* и *Enterococcus faecalis* [4-6]. Это привело к новой волне интереса к грамположительным бактериям в качестве потенциальных электрогенов, в том числе в качестве биокатализаторов для электрохимических биосенсоров.

Одним из перспективных биокатализаторов для электрохимических биосенсоров могут являться бактерии рода *Rhodococcus*. Это филогенетически и физиологически разнообразная группа бактерий в составе нокардиоформных актиномицетов. Они были выделены из самых разных источников, включая почву, горные породы, подземные воды, морские отложения, фекалии животных, внутренние органы насекомых, здоровых и больных животных и растений. Представители рода *Rhodococcus* демонстрируют выдающуюся способность к деградации и трансформации широкого спектра природных органических и ксенобиотических соединений через разнообразные катаболические пути [7]. Помимо способности метаболизировать широкий спектр химических соединений, толерантность клеток к токсичным субстратам и растворителям, частое отсутствие репрессии катаболитов, производство биосурфактантов и устойчивость в окружающей среде делают их отличными кандидатами для биоремедиации и биоконверсии, а также используются в составе биосенсоров.

В качестве потенциального биокатализатора в работе была использована культура, выделенная из корродированного сплава металлов. Штамм SiAl был идентифицирован на основании сравнения 16SpPHK и показал наибольшее сходство с *Rhodococcus electrodiphilus*, а именно 99,71%.

Цель работы – оценка электрогенности изолята *R. electrodiphilus* SiAl и возможности его использования в составе электрохимического биосенсора. Для этого изучали его способность к переносу электронов на внешние акцепторы, а именно на графитовые печатные электроды.

Культивирование микроорганизмов проводили на жидкой и агаризованной среде 5/5 состава: аминокептид – 60 мл, триптон – 5 г, дрожжевой экстракт – 1 г, соевый экстракт – 30 мл, агар-агар – 20 г, вода дистиллированная до 1000 мл; pH 7.2. Полученную биомассу из культуральной жидкости центрифугировали при комнатной температуре 10 минут (10000 об/мин) и ресуспендировали. Измерения электрогенной активности микроорганизмов производили с использованием электрохимических биосенсоров второго поколения, основой которых служили трехконтактные графитовые печатные электроды (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, Россия).

Для оценки электрогенного потенциала бактерий *Rhodococcus* был использован метод циклической вольтамперометрии. Для этого были получены циклические вольтамперные характеристики электрода (рис. 1), на котором была адсорбированы бактериальные клетки *R. electrodiphilus* SiAl в фосфатном буфере. Измерение проводили в присутствии медиатора электронного транспорта – 2,6-дихлорофенолиндофенола (ДХФИФ, 138 мкМ) и субстрата – глюкозы (5 мМ). Из рисунка видно, что при добавлении в буфер медиатора и субстрата величина тока окисления в диапазоне увеличивается от 200 до 620 нА, что свидетельствует о наличии переноса электронов в данной системе.

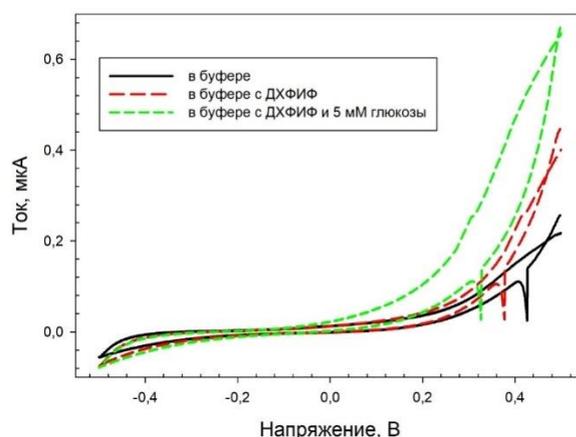


Рисунок 1. Циклические вольтамперограммы для электрода с иммобилизованными сорбцией клетками *Rhodococcus electrodiphilus* SiAl в различных условиях измерения

Возможность использования данных микроорганизмов как биокатализатора для электрохимических биосенсоров оценили с помощью метода хроноамперометрии. Для этого изучили изменение уровня тока электрода при добавлении субстрата. На рис. 2. показан типичный вид сигнала биосенсора на основе адсорбированных на рабочем электроде клеток *R. electrodiphilus* SiAl на введение ДХФИФ и глюкозы.

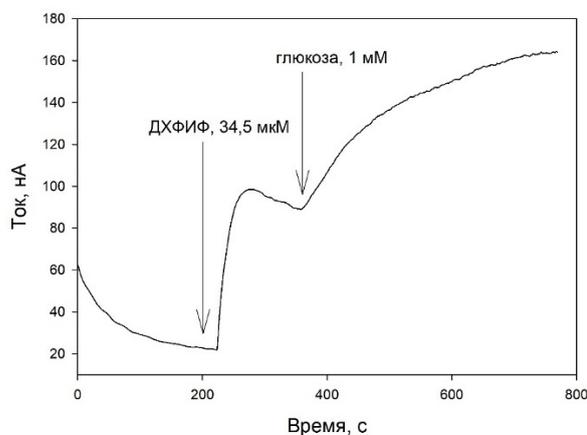


Рисунок 2. Изменение уровня тока биосенсора при введении ДХФИФ (34,5 мкМ) и глюкозы (1 мМ). Введение субстратов показано стрелками.

Как видно из рис. 2, 2,6–дихлорофенолиндофенол, который часто применяется в электрохимических микробных биосенсорах в качестве медиатора электронного транспорта [8], является субстратом для клеток *R. electrodiphilus* SiAl, что осложняет его использование в этом качестве в электрохимическом биосенсоре. Тем не менее, его применение позволяет регистрировать увеличение тока биосенсора при биотрансформации клетками дополнительного субстрата, например, глюкозы. В отсутствие данного медиатора амперометрического сигнала на введение глюкозы в измерительную кювету не наблюдали ни в случае регистрации циклических вольтамперограмм, ни в случае хроноамперометрических измерений.

Оценили влияние уровня pH измерительного раствора на сигнал биосенсора при введении ДХФИФ. Показали, что оптимальным является буферный раствор с pH = 7,6. Было изучено влияние концентрации ДХФИФ на отклик биосенсора. Сигнал биосенсора достигал уровня в 40 нА при достижении концентрации 65 мкМ, дальнейшее увеличение концентрации не приводило

к увеличению сигнала. Была изучена стабильность электрода при непрерывном измерении ДХФИФ (34,5 мкМ) в течение суток. Сигнал биосенсора уменьшился на 60% за первые 10 измерений, а затем стабилизировался на уровне ~ 40 нА.

Были изучены сигналы биосенсора на основе *R. electrodiphilus* SiAl на различные концентрации глюкозы и построены калибровочные зависимости. Полученные данные глюкозы были обработаны с помощью четырехпараметрического уравнения Хилла:

$$I = I_0 + \frac{I_{max} \times S^h}{K_M^h + S^h},$$

где I_{max} – максимальный сигнал биосенсора, достигаемый при концентрации субстрата (S), стремящейся к бесконечности; K_M^h – кажущаяся константа Михаэлиса-Ментен, h – коэффициент Хилла, I_0 – начальная скорость реакции.

Коэффициент Хилла для данного биосенсора больше 0, что говорит о положительной кооперативности (т.е. присоединение одной молекулы субстрата облегчает присоединение следующих) ферментных систем данного микроорганизма. Значение кажущейся константы Михаэлиса составило $0,041 \pm 0,005$, что свидетельствует о высоком сродстве биокатализатора к глюкозе. Диапазон детекции составил 0,005 – 0,30 мМ, при этом чувствительность биосенсора в линейном диапазоне составила $1697,80 \text{ нА} \cdot \text{мМ}^{-1}$.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии электрогенных свойств у изолята грамположительного микроорганизма *Rhodococcus electrodiphilus* SiAl. Наличие электрохимического отклика бактерий в присутствии 2,6-дихлорофенолиндофенола свидетельствует о потенциале применения данного штамма для создания биосенсоров, которые могут быть применены при детекции различных фенольных соединений.

Библиографический список

1. Rabaey K., Angenent L., Schroder U., Keller J. Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application, 1st ed. IWA Publishing: London, UK.
2. Choi S. Electrogenic Bacteria Promise New Opportunities for Powering, Sensing, and Synthesizing // Small. 2022. V. 18. 2107902. <https://doi.org/10.1002/sml.202107902>
3. Doyle L. E., Marsili E. Weak electricigens: A new avenue for bioelectrochemical research // Bioresource Technology. 2018.V. 258. P. 354–364. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.073
4. Light S.H., Su L., Rivera-Lugo R. et al. A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria // Nature. 2018. V. 562. № 7725. P. 140–144. doi: 10.1038/s41586-018-0498-z.
5. Pankratova G., Leech D., Gorton L., Hederstedt, L. Extracellular Electron Transfer by the Gram-Positive Bacterium *Enterococcus faecalis* // Biochemistry. 2018. V. 57. № 30. P. 4597–4603. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00600
6. Keogh D., Lam L.N., Doyle L.E. et al. Extracellular Electron Transfer Powers *Enterococcus faecalis* Biofilm Metabolism // mBio. 2018. V. 9. № 2.e00626-17. doi: 10.1128/mBio.00626-17.
7. Filonov A., Akhmetov L., Puntus I., Solyanikova I. Removal of oil spills in temperate and cold climates of Russia experience in the creation and use of biopreparations based on effective microbial consortia // Biodegradation, Pollutants and Bioremediation Principles. Bidoia, E.D., Motagnolli, R.N., Eds.; Taylor's & Francis CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2021.P. 137–159.
8. Reshetilov A., Alferov S., Tomashevskaya L., Ponamoreva O. Testing of Bacteria *Gluconobacter Oxydans* and Electron Transport Mediators Composition for Application in Biofuel Cell // Electroanalysis. 2006. V. 18. P. 2030–2034.