ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК, 2015, том 464, № 5, с. 629–632

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 612.015.1; 577.15; 543.94

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *Shewanella oneidensis* MR-1

© 2015 г. В. В. Шумянцева, А. С. Шебанова, Я. М. Чаленко, Т. А. Воейкова, академик РАН М. П. Кирпичников, К. В. Шайтан, академик РАН В. Г. Дебабов

Поступило 11.06.2015 г.

Проведено исследование электрохимических параметров бактериальных клеток *Shewanella oneidensis* MR-1. Для регистрации прямого переноса электронов между *S. oneidensis* MR-1 и электродом клетки предварительно обрабатывали мембраноразрыхляющим веществом – додецилдиметиламмоний бромидом (ДДАБ), что позволило повысить эффективность переноса электронов клеток за счет большей доступности электроактивных белков. Электроанализ бактериальных клеток *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях позволяет зарегистрировать редокс-активные белки и биомолекулы в области восстановительных и окислительных потенциалов: –0.40, –0.16, –0.0 В, что соответствует флавогемопротеинам, производным хинона и цитохромам *c*-типа внешней мембраны бактериальных клеток *S. oneidensis* MR-1.

DOI: 10.7868/S0869565215290277

Электромикробиология – современное направление науки, исследующее взаимодействие между микроорганизмами и электронными устройствами, а также изучающее электрохимические свойства микроорганизмов [1, 2]. Электроанализ бактериальных клеток позволяет исследовать каталитические и электрохимические свойства электротранспортных белков клеток, анализировать метаболические клеточные процессы, прогнозировать резистентность бактериальных клеток к антибиотикам, использовать клетки для “зелёного” синтеза наночастиц металлов.

Штамм *Shewanella oneidensis* MR-1 содержит грамотрицательные, факультативно анаэробные электрогенные бактерии, способные восстанавливать различные соединения и передавать электроны во внешнюю среду и на твердые поверхности. С помощью бактерий рода *Shewanella* были получены наночастицы золота, серебра, сульфидов металлов, уранита [3]. Электрогенные бактерии могут обмениваться электронами непосредственно без добавления каких-либо экзогенных посредников с электродами. Установлено, что в геноме клеток штамма MR-1 присутствуют гены, кодирующие 41 вид цитохромов *c*-типа [4]. *S. oneidensis* MR-1 обладают уникальной разветвленной электронтранспортной цепью (ЭТЦ), в составе которой мультигемовые цитохромы *c*-типа располагаются на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, в периплазме и внешней мембране, образуя единый ансамбль [2, 5, 6]. Восстановление большинства внеклеточных электронных акцепторов осуществляется с помощью терминальной редуктазы дыхательной цепи – протеинового комплекса, сформированного из цитохромов *c* MtrA, MtrB и MtrC, который расположен вне клетки [7, 8].

В настоящей работе были впервые исследованы электрохимические свойства клеток *S. oneidensis* MR-1, предварительно обработанных мембраноразрыхляющим реагентом, что позволило осуществить прямую регистрацию электронного переноса с использованием графитовых планарных электродов.

Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата μAUTOLAB (“Metrohm Autolab”, Нидерланды), снабженного программным обеспечением GPES (версия 4.9.7). В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП “АвтоКом”, Россия, *http://www.membrans.ru*), с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы приведены относительно хлорсеребряного (Ag/AgCl) электрода сравнения. Эксперименты с

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва
E-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва
Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии наук, Москва

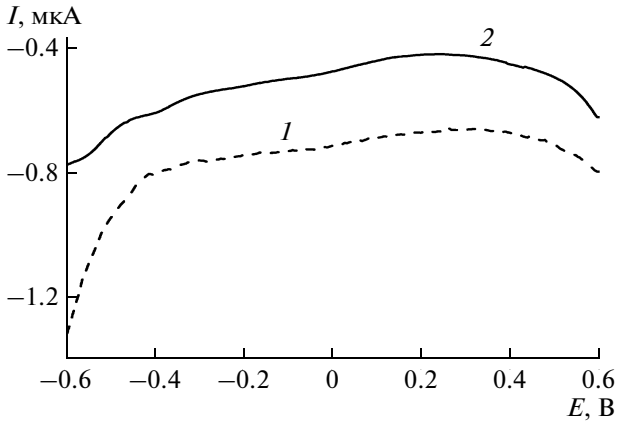

Рис. 1. Квадратно-волновые вольтамперограммы ПГЭ (*1*) и электрода ПГЭ/*S. oneidensis* MR-1 (*2*) в аэробных условиях. Частота 10 Гц; здесь и на рис. 2 и 3 концентрация клеток $1 \cdot 10^5$ КОЕ/электрод.

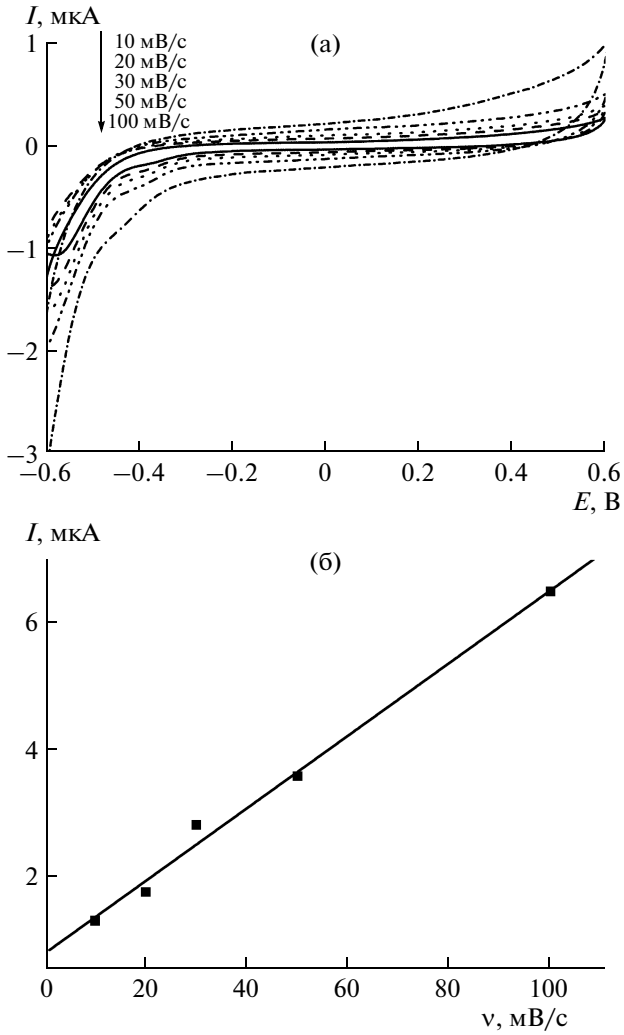

Рис. 2. (а) Циклические вольтамперограммы электродов ПГЭ/*S. oneidensis* MR-1 в диапазоне скоростей сканирования 0.01 до 0.1 В/с в аэробных условиях. (б) Зависимость от скорости сканирования ν в аэробных условиях катодного пика циклических вольтамперограмм электродов ПГЭ/*S. oneidensis* MR-1 в диапазоне скоростей сканирования 0.01 до 0.1 В/с.

клетками штамма MR-1 проводили в стерильных условиях.

Для исследования электрохимических свойств MR-1 клетки помещали в 0.1 М фосфатно-солевой буфер, pH 7.4. Модификацию поверхности рабочего электрода осуществляли 0.1 М раствором ДДАБ в хлороформе [9]. В опытах с клеточными суспензиями клетки MR-1 суспендировали в 15%-м глицерине. В каждом эксперименте в качестве контрольного электрода использовали электрод, модифицированный 0.1 М ДДАБ в хлороформе без иммобилизованного биологического материала.

На поверхность рабочего электрода наносили 2 мкл 0.1 М раствора ДДАБ в хлороформе. Химически модифицированный электрод высушивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем на поверхность модифицированного рабочего (индикаторного) электрода наносили 2 мкл суспензии клеток MR-1, обработанных или не обработанных водным раствором ДДАБ. Концентрация клеток составляла $1 \cdot 10^5$–$1 \cdot 10^4$ КОЕ/электрод (КОЕ – колониеобразующая единица). После нанесения клеток электроды инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин.

Ранее было показано [1], что при иммобилизации бактериальных клеток *E. coli* JM109 на графитовых электродах, полученных методом трафаретной печати (печатный графитовый электрод, ПГЭ), при потенциале -0.4 ± 0.05 В регистрируется прямой безмедиаторный перенос электронов с участием окислительно-восстановительных ферментов клеток *E. coli* JM109 – цитохромов *c*-типа, локализованных на внешней мембране клетки, редуктаз, дегидрогеназ, флавопротеинов.

Прямой перенос электронов в клетках MR-1 был установлен с помощью метода квадратно-волновой вольтамперометрии: восстановительный катодный пик зарегистрирован в области потенциалов −0.35...−0.40 В (рис. 1). Однако полученные данные не позволяли дать четкую электрохимическую характеристику редокс-компонентов клеток.

Мембраноразрыхляющие и интеркалирующие в мембраны реагенты, такие как тетрахлорферраты, органические соли аммония, пиридиния, соединения морфолиния, оксистерины, олигоэлектролиты, способствуют созданию более рыхлой структуры биологической мембраны эукариот и бактерий [10, 11]. В результате предобработки клеток мембраноразрыхляющим агентом ДДАБ стала возможной регистрация электроак-

тивности мембранных и периплазматических белков, что способствовало более активному процессу переноса и обмена электронов между электродом и электроактивными компонентами бактериальной клетки (рис. 2а).

Инкубация клеток с мембраноразрыхляющим реагентом – 0.1 М водным раствором ДДАБ – в течение 15 мин позволила получить наибольшее значение амплитуды катодного пика в области потенциалов –0.39...–0.41 В. Дальнейшая инкубация клеток в этом растворе привела к снижению интенсивности катодного пика (табл. 1). Это может быть связано с диссоциацией мембранных электроактивных белков из бислоя мембраны в раствор электролита. Таким образом, инкубация клеток в 0.1 М водном растворе ДДАБ в течение 15 мин является оптимальной для получения максимально интенсивного пика.

Из данных рис. 2б видно, что имеется линейная зависимость катодного пика в области потенциалов –0.37...–0.39 В от скорости сканирования. Такая зависимость характерна для процессов, протекающих на поверхности электрода, а не в растворе электроактивного компонента [12]. Работа с химически модифицированными электродами (модификация электродов ДДАБ) позволяет фиксировать клетки на поверхности сенсора, способствуя переходу электродных процессов в режим именно поверхностных процессов.

При оптимальном отношении компонентов и времени инкубации мембраноразрыхляющие реагенты делают мембрану клеток “прозрачной” для электронов, но недостаточно проницаемой для электроактивных компонентов, препятствуя их вытеканию в раствор. Таким образом, обработка клеток мембраноразрыхляющими реагентами способствует более эффективной регистрации прямого переноса электронов в клетках и идентификации электроактивных компонентов бактериальной клетки.

Электроанализ бактериальных клеток *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях (с предобработкой 0.1 М водным раствором ДДАБ в отношении 10 : 1, 15 мин, комнатная температура) позволяет зарегистрировать редокс-активные белки и биомолекулы при значениях восстановительных и окислительных потенциалов, равных –0.40, –0.16 и –0.0 В (рис. 3). Для бактериальных клеток *Shewanella loihica* PV-4 с помощью циклической вольтамперометрии были идентифицированы три редокс-активных центра: область потенциалов –0.42 В соответствует окислительно-восстановительному потенциалу рибофлавина (флавогемопротеинам), область потенциалов –0.20...–0.27 В – производным хинона, область потенциалов 0.0...–0.07 В соответствует цитохромам *c*-типа внешней мембраны [13, 14]. Можно предположить, что в наших экспериментах для клеток *S. oneidensis* MR-1 также идентифицируются три группы редокс-активных компонентов: –0.40 В – флавогемопротеины; –0.16 В – хиноны; –0.0 В – цитохромы *c*-типа внешней мембраны.

Таблица 1. Значение величины амплитуды катодного пика квадратно-волновых вольтамперограмм от времени предобработки клеток *S. oneidensis* MR-1 водным раствором ДДАБ

Время инкубации, мин	Потенциал катодного пика, В	Высота катодного пика, 10^{-8} А
10	–0.386	–1.17
15	**–0.386**	**–3.10**
20	–0.386	–2.61
25	–0.398	–2.66
30	–0.409	–1.82

Полужирным шрифтом выделены значения наиболее интенсивного сигнала при инкубации с водным раствором ДДАБ в течение 15 мин.

Важной характеристикой биоэлектродов является зависимость интенсивности электрохимического сигнала от концентрации биологического материала. Было проведено исследование зависимости величины сигнала от концентрации клеток на электроде. Для этого были приготовлены серии разведений клеточной суспензии. Результаты анализа методом квадратно-волновой вольтамперометрии представлены в табл. 2.

Наибольшее значение величины сигнала катодного пика наблюдается при концентрации

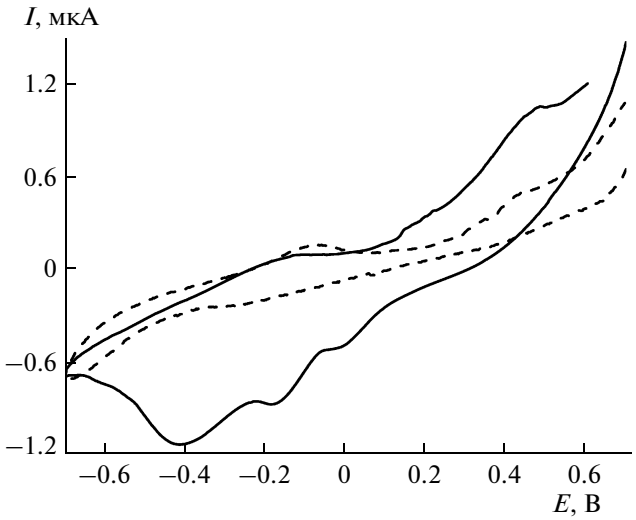

Рис. 3. Циклические вольтамперограммы ПГЭ (пунктирная линия) и электрода ПГЭ/*S. oneidensis* MR-1 (сплошная линия) в анаэробных условиях. Скорость сканирования 0.02 В/с. Клетки *S. oneidensis* MR-1 были предварительно обработаны 0.1 М водным раствором ДДАБ.

Таблица 2. Значение величины интенсивности амплитуды катодного пика и площади катодного пика квадратно-волновых вольтамперограмм от концентрации клеток *S. oneidensis* MR-1 на электроде

Концентрация, КОЕ/электрод	Потенциал, В	Интенсивность катодного пика, А	Площадь катодного пика, А · В
$1 \cdot 10^5$	−0.401	−1.019e-8	5.715e-10
$1.1 \cdot 10^4$	−0.401	−4.268E-8	2.853E-9
$2.5 \cdot 10^4$	−0.386	−3.519E-8	2.095E-9
$2.7 \cdot 10^3$	−0.411	−3.899E-8	2.548E-9
$6.25 \cdot 10^3$	**−0.377**	**−4.342e-8**	**2.752E-9**
$8.2 \cdot 10^2$	–	–	–

Полужирным шрифтом выделены значения наиболее интенсивного сигнала при концентрации клеток, равной $6.25 \cdot 10^3$ КОЕ/электрод; (–) – отсутствие сигналов (при максимальной концентрации пики не регистрировались, возможно, из-за перехода в более плотную пленку).

клеток на электроде, равной $6.25 \cdot 10^3$ КОЕ/электрод, что может быть связано с более выгодной ориентацией иммобилизованного клеточного материала на поверхности рабочего графитового электрода, оптимизирующей перенос электронов [14]. Известно, что клетки *S. oneidensis* MR-1 представляют собой прямые или слегка изогнутые палочковидные бактерии размером 1.5–4.6 × 0.4–1 мкм. Наши расчеты показывают, что при площади электрода, составляющей 3.14 мм^2, и оптимальной концентрации клеток на электроде бактерии будут располагаться на поверхности электрода в виде монослоя. По-видимому, это оптимальное расположение клеток для регистрации электрохимического сигнала.

Тиосульфат натрия является сильным восстановителем и используется для биосинтеза наночастиц сульфида серебра в присутствии клеточных суспензий. В нашей работе было исследовано влияние тиосульфата натрия на электрохимические свойства *S. oneidensis* MR-1. В присутствии тиосульфата натрия перенос электронов становится более эффективным, так как катодный пик смещается в более положительную область на 70 ± 5 мВ, а интенсивность пика возрастает: высота пика $5.29 \cdot 10^{-8}$ и $5.46 \cdot 10^{-8}$ А соответственно. Влияние восстановителя дитионита натрия на ферменты, участвующие в переносе электронов клеток *Shewanella*, было исследовано ранее [15]. Авторы также показали модулирование редокс-состояний простетических групп белков с помощью этого восстановителя.

Итак, проведен электроанализ бактериальных клеток *S. oneidensis* MR-1. Показано, что электроактивность клеток может быть зарегистрирована с помощью графитовых электродов, полученных методом трафаретной печати. Для модификации рабочей поверхности электродов и для предобработки клеток с целью разрыхления внешней мембраны и активизации процессов обмена электронов между электродом и электроактивными компонентами бактерий был использован ДДАБ.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг., а также при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13–04–00220) и Программы Президиума РАН № 24.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bartlett P.* // Bioelectrochemistry. Fundamentals, Experimental Techniques and Applications. N.Y.: Wiley, 2008.
2. *Lovley D.* Ann. Rev. Microbiol. 2012. V. 66. P. 391–409.
3. *Yang Y., Xu M., Guo J., Sun G.* // Process Biochem. 2012. V. 47. P. 1707-1714.
4. *Suresh K., Doktycz M., Wang W., Moon J., Gu H.M., Meyer III D.K., Hensley D., Allison D., Phelps T., Pelletier D.* // Acta biomater. 2011. V. 7. P. 4253–4258.
5. *Meyer T., Tsapin A., Vandenberghe I., Smet L., Frishman D., Nealson K., Cusanovich M., Van Beeumen J.* // OMICS. J. Integrative Biol. 2004. V. 8. P. 57–77.
6. *Schuetz B., Schicklberger M., Kuermann J., Spormann A., Gescher J.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 7789–7796.
7. *Bucking C., Piepenbrock A., Kappler A., Gescher J.* // Microbiology. 2012. V. 158. P. 2144–2157.
8. *Shungui Z., Jiahuan T., Yong Y.* // Bioelectrochemistry. 2015. V. 102. P. 29–34.
9. *Chalenko Y., Shumyantseva V., Ermolaeva S., Archakov A.* // Biosens. Bioelectron. 2012. V. 32. P. 219–223.
10. *Wang V., Kirchhofer N., Chen X., Tan M., Sivakumar K., Cao B., Xhang Q., Kjelleberg S., Bazan G., Loo S., Marsili E.* // Electrochem. Commun. 2014. V. 41. P. 55–58.
11. *Olsen B., Schlesinger P., Ory D., Baker N.* // Biophys. J. 2011. V. 100. P. 948–956.
12. *Bard A.E., Faulkner L.R.* Electrochemical Methods. Fundamental and Applications. 2nd ed. N.Y.: Wiley, 2001.
13. *Jain A., Zhang X., Pastorella G., Connolly J., Barry N., Woolley R., Krishnamurthy S., Marsili E.* // Bioelectrochemistry. 2012. V. 87. P. 28–32.
14. *Okamoto A., Hashimoto K., Nakamura R.* // Bioelectrochemistry. 2012. V. 85. P. 61–65.
15. *Paquete C., Saraiva I., Louro R.* // Biochim. et biophys. acta. 2014. V. 1837. P. 717–725.