

УДК 57.083.13+57.083.18+577.337

## ОЧИСТКА НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ С НИЗКИМ ВЫХОДОМ CO<sub>2</sub> В ОСАДОЧНОМ МИКРОБНОМ ТОПЛИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ<sup>1</sup>

© 2025 г. Г. С. Ключин<sup>a</sup>, А. С. Гогов<sup>a, b</sup>, А. Е. Колонский<sup>a, c</sup>, А. Р. Строева<sup>d</sup>,  
И. М. Елизаров<sup>a</sup>, А. А. Ключкина<sup>a</sup>, С. Н. Гаврилов<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Россия

<sup>b</sup>НИЦ “Курчатовский институт”, 123098, Москва, Россия

<sup>c</sup>Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий,  
121205, Москва, Россия

<sup>d</sup>Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Россия

\*e-mail: [sgavrilov@gmail.com](mailto:sgavrilov@gmail.com)

Поступила в редакцию 16.10.2024 г.

После исправления 12.11.2024 г.

Принята к опубликованию 13.11.2024 г.

Активное изучение электрокаталитических свойств прокариот в последние 30 лет привело к созданию новой области биотехнологии — генерации электричества в микробных топливных или электролитических элементах, где клетки микроорганизмов выступают биокатализаторами анодных или катодных процессов, потребляющими органическое вещество, либо образующими биомассу и вещества с добавленной стоимостью при электротрофной фиксации CO<sub>2</sub>. Наиболее экономически перспективным считается применение микробных топливных элементов (МТЭ) для очистки сточных вод и в процессах биоремедиации. В последнее время рассматриваются перспективы внедрения МТЭ или стимуляции электроактивных микробных сообществ для очистки нефтезагрязненных анаэробных слоев почв и морских осадков. Однако этот вариант технологии имеет ряд существенных технических ограничений. Мы описываем лабораторный осадочный МТЭ с биоанодом и биокатодом, инокулированный нефтезагрязненной почвой, который в течение 210 сут непрерывной работы являлся единственным источником электропитания для автономного датчика контроля параметров окружающего воздуха. Генерация электрического тока в МТЭ сопровождалась деструкцией углеводов в загрязненной почве и формированием различных микробных популяций в анаэробном слое почвы, на аноде и на катоде, в которых доминировали, соответственно, потенциальные нефтеструкторы, электрогены и электротрофы. При этом выход CO<sub>2</sub> на фоне окружающего воздуха был минимален, что указывает на формирование в МТЭ эффективного газового фильтра. Кратковременное инкубирование МТЭ в полевых условиях выявило значительное влияние колебаний температуры на физико-химические параметры устройства, его производительность и состав катодной микробной популяции. Мы подробно рассматриваем изменения филогенетического и физиологического разнообразия микробных популяций различных зон осадочного МТЭ в процессе его работы, а также намечаем перспективы и проблемы практического применения подобных систем для биоремедиации нефтезагрязненной почвы.

**Ключевые слова:** электроактивные микроорганизмы, электрогены, электротрофы, биоремедиация нефтезагрязненных почв, гетеротрофная фиксация CO<sub>2</sub>, микробный топливный элемент

DOI: 10.31857/S0026365625020019

Микроорганизмы, способные получать энергию для роста при использовании химически инертных электродов (графитовых, платиновых, титановых) в качестве доноров или акцепторов электронов, объединяют термином “электроактивные”

(electroactive). Все ныне известные электроактивные микроорганизмы можно условно подразделить на электрогенов, которые отдают электроны на внеклеточный акцептор и генерируют электрический ток в микробных топливных элементах

<sup>1</sup>Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: DOI: 10.31857/S0026365625020019

(МТЭ), и электротрофов, которые принимают электроны от внеклеточного донора и катализируют катодные процессы в микробных электролитических элементах (МЭЭ). Известно также немало прокариот, которые могут в зависимости от условий культивирования быть либо электрогенами, либо электротрофами, как, например, *Geobacter metallireducens* (Lovley, Holmes, 2021). Работы последнего десятилетия показали широкое распространение электроактивных микроорганизмов в самых разнообразных природных осадочных экосистемах (Logan et al., 2019). Немного ранее была сформирована концепция “биогеобатарей”, согласно которой микроорганизмы анаэробных слоев осадочной толщи при наличии в ней достаточного количества электропроводящих элементов, например, частиц магнетита или угля, способны передавать электроны, получаемые при окислении органических и неорганических доноров, к поверхностным, аэробно дышащим микроорганизмам (Ntarlagiannis et al., 2007). Тем самым формируется электрохимическая и метаболическая взаимосвязь между глубинными процессами анаэробного разложения органического вещества и наиболее энергетически выгодными процессами аэробного дыхания на поверхности осадков. Исследования в этой области позволили открыть такое природное явление, как прямой межвидовой перенос электронов (DIET; Wang et al., 2016), который наравне с прямым внеклеточным переносом электронов (ВПЭ) от электроактивных клеток к минералам служит основным механизмом электрохимических взаимодействий в природных осадочных экосистемах и в конструируемых биоэлектрохимических системах (БЭС) (Lovley, Holmes, 2021). К настоящему времени максимальная электрогенная активность в БЭС отмечена для мезофильных грамотрицательных железовосстанавливающих бактерий вида *Geobacter sulfurreducens* (3900 мВт/м<sup>2</sup>; Logan et al., 2019).

Геномные данные указывают на довольно раннее возникновение способности к ВПЭ в ходе эволюции прокариот (Lusk, 2019). Очевидным эволюционным давлением для возникновения этой способности были широкое распространение минералов железа в условиях горячей бескислородной Земли и термодинамическая выгода от их восстановления. Неудивительно, что электрогены были выявлены среди гипертермофильных архей, принадлежащих к глубоким филогенетическим линиям (Logan et al., 2019). Наибольшей активностью среди известных электрогенных экстремофилов выделяются термофильные бактерии “*Thermincola potens*” (Carlson et al., 2012), близкородственные им *T. ferriacetica* (Marshall, May, 2009) и другие представители рода *Thermincola*. Активные исследования электротрофии в гипертермофильных микробных сообществах привели

к возникновению концепции нового, “третьего”, варианта автотрофного питания живых организмов – “электросинтеза”, рассматриваемого отдельно, наравне с хемо- и фотосинтезом (Yamamoto et al., 2022).

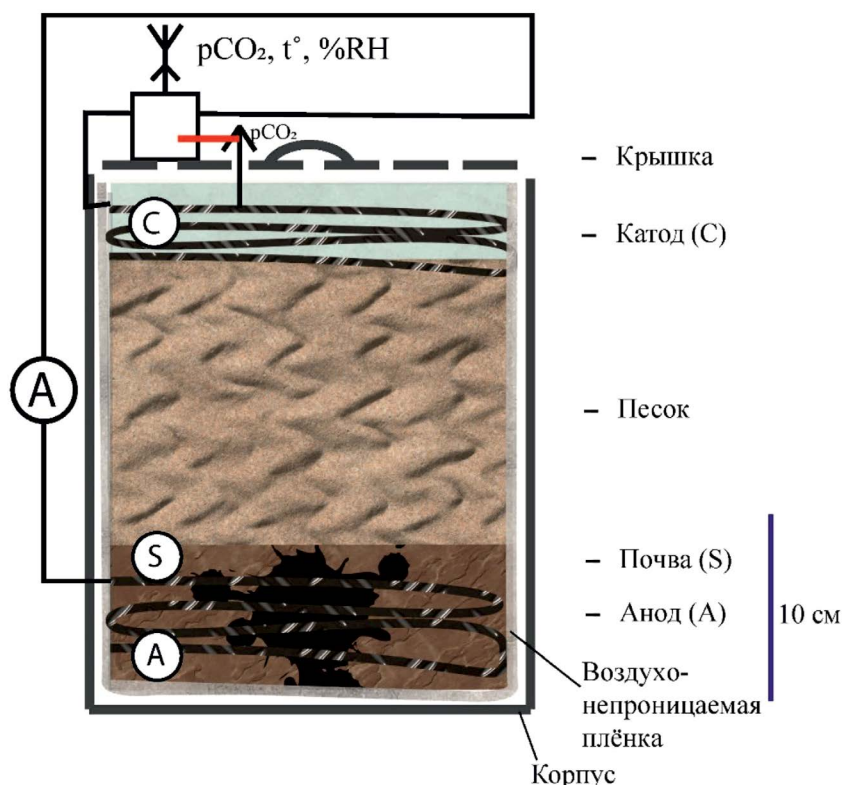
Исследования механизмов микробной электроактивности продвигают и практические разработки, основанные на использовании БЭС. Одним из наиболее экономически перспективных вариантов их применения считается генерация электричества, сопряженная с очисткой сточных вод или биоремедиацией осадочных экосистем (Chen et al., 2020). В последнее время появился значительный интерес к применению МТЭ для биоремедиации нефтезагрязненных почв и морских осадков. Была предложена схема простых устройств, стимулирующих электроактивные микробные сообщества, способные к нефтедеструкции, путем заглубления проводящих материалов (графитовых или металлических стержней) в анаэробную часть почвы или осадка и обеспечения с их помощью потока электронов к поверхностному влажному слою экосистемы, где происходит электрохимическое восстановление кислорода до воды. Такие БЭС не подразумевают питание полезной нагрузки, но могут существенно упростить и удешевить ремедиацию анаэробных осадочных сред, для которых в настоящее время требуется активное механическое перемешивание для обеспечения доступа кислорода воздуха к аэробным нефтедеструкторам. Новый вариант ремедиации получил общее название “electro snorkel” (“электрическое дыхание через трубку для плавания”; Erable et al., 2011; Cruz Vicci et al., 2015). Позднее было описано сходство таких систем с вертикальными нитчатыми колониями “кабельных бактерий”, способных выполнять экологическую функцию электропроводящих стержней в морских нефтезагрязненных осадках (Matturro et al., 2017). Недавно были описаны подобные БЭС, в которых катодными катализаторами выступали электротрофные микроорганизмы (Roginska et al., 2021). Однако во всех ранее описанных системах “electro snorkel” не подразумевалась генерация электрического тока для полезной нагрузки, а созданные на сегодняшний день МТЭ для генерации электричества, сопряженной с очисткой нефтезагрязнений, достаточно дороги в устройстве, что делает их экономически невыгодными (Ambaye et al., 2023). Кроме того, ряд аспектов использования БЭС для биоремедиации, в частности, продукция CO<sub>2</sub> при нефтедеструкции и влияние погодных факторов на эффективность применения МТЭ в полевых условиях, остаются неопределенными.

Мы описываем лабораторный прототип осадочного МТЭ с биоанодом и биокатодом, в котором происходит очистка нефтезагрязненной

почвы за счет преимущественно анаэробных процессов деструкции углеводов в анодной зоне. При этом зона хемоклина, созданная между анодной и катодной зонами, а также метаболическая активность катодной микробной популяции служат эффективным фильтром, поглощающим выделяющийся при нефтедеструкции  $\text{CO}_2$ , предположительно, за счет его гетеротрофной фиксации. МТЭ в течение 210 сут непрерывной работы питал автономный датчик, измерявший в режиме реального времени концентрацию  $\text{CO}_2$  в воздухе, температуру и влажность воздуха и передававший раз в сутки данные по радиоканалу на удаленное устройство. Кратковременное инкубирование МТЭ на открытом воздухе выявило существенное негативное влияние резких перепадов окружающей температуры на эффективность работы устройства, что требует дальнейшей оценки при планировании практического применения МТЭ в процессах биоремедиации. По нашим сведениям, это первое сообщение о самоподдерживающемся микробном топливном элементе, питающем полезную нагрузку, в котором происходит очистка нефтезагрязненной почвы с низким выходом парникового газа  $\text{CO}_2$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Инокулят осадочного МТЭ.** В качестве инокулята была использована смешанная проба нефтезагрязненных почв, отобранных в лесопарке Винновская роща г. Ульяновска. Пробы были отобраны в нескольких точках лесопарка, которые порядка 50 лет подвергаются загрязнению нефтепродуктами. Предположительно, нефтепродукты являются смесью различных топлив, но точный состав загрязнителя и источник загрязнения на момент отбора проб известен не был (Кулагина и соавт., 2012). Пробы были отобраны в 2019 г. и любезно предоставлены для наших исследований сотрудниками ООО «Лаборатория микробных технологий» (ЛМТ). До начала наших работ пробы хранились в плотно закрытых пластиковых флаконах в холодильнике при  $4^\circ\text{C}$ . Для загрузки в осадочный МТЭ было использовано 10 проб влажной почвы общим объемом 1.5 л, которые были предварительно перемешаны и в состоянии густой пасты заложены в нижнюю, «анодную», часть МТЭ в несколько слоев, которые, в свою очередь, переслаивались складками углеткани, использовавшейся в качестве анода (рис. 1).



**Рис. 1.** Масштабная схема устройства осадочного МТЭ. Черной стрелкой вверх показано направление газообмена через отверстие в крышке катодной зоны, красной линией указано положение луча ИК-детектора  $p\text{CO}_2$  в составе датчика полезной нагрузки БМ-2. С, S, A — обозначения мест отбора проб для анализа физико-химических параметров и состава микробных популяций (“Cathode”, “Soil”, “Anode”).

**Сборка осадочного МТЭ.** Конструкция МТЭ представляла собой вертикальную колонку, состоящую из нескольких ключевых компонентов, расположенных по слоям снизу вверх. Корпус МТЭ представлял собой ведро из ПВХ объемом 10 л с крышкой, дно и стенки которого были выстланы изнутри мешком из высокобарьерной воздухо-непроницаемой полимерной пленки EVONH (“РусУпак”, Россия), предварительно стерилизованной гамма-излучением. В нижней части была расположена анодная область с инокулятом, переслоенным углетканью. Над анодной частью располагался слой мелкодисперсного кварцевого песка. Анодная область и слой песка были залиты стерильной дистиллированной водой, которая покрывала поверхность песка на 5 см, в этом поверхностном слое воды после предварительного отстаивания МТЭ (см. ниже) был размещен уложенный стопкой углетканевый катод (рис. 1). В процессе отстаивания с дистиллированной водой в МТЭ формировался электролит, схожий по составу с водной почвенной вытяжкой, приготовленной по классической методике (Соколова и соавт., 2012). Техника сборки электродов подробно указана в Дополнительных материалах (раздел “Методы”). Толщина анодной части полученного МТЭ оставляла 9 см, толщина слоя песка с водой составляла 18 см (рис. 1). Слой песка с водой выполнял роль хемоклина по окислительно-восстановительному потенциалу, а также “мембраны”, разграничивавшей анаэробную анодную и аэробную катодную зоны и проводящей протоны между ними, замыкая, таким образом, электрическую цепь топливного элемента после подсоединения электродов к полезной нагрузке. Корпус МТЭ закрывали пластиковой крышкой с множественными отверстиями, закрытыми стерильной марлей. Снаружи, на крышке размещали полезную нагрузку МТЭ (датчик БМ-2, см. ниже) и микроамперметр, подключенные в сеть между анодом и катодом последовательно. Отверстия обеспечивали доступ воздуха в катодную камеру и доступ газовой фазы МТЭ к детектору  $\text{CO}_2$ , встроенному в БМ-2.

**Постановка эксперимента.** После сборки МТЭ без катода был оставлен на трое суток в разомкнутом состоянии при комнатной температуре для стабилизации анодного, катодного и “мембранного” слоев, а также параметров pH, окислительно-восстановительного потенциала ( $E_h$ ) и температуры. После отстаивания МТЭ с поверхности воды катодной зоны была удалена пленка всплывших углеводов для обеспечения свободного доступа воздуха к поверхности катода, затем в катодную зону был помещен сложенный стопкой катод, и после его полного намокания были измерены начальные значения pH,  $E_h$ , содержания углеводов в катодной зоне, ЭДС и тока короткого замыкания. Сразу после измерений и отбора начальных проб цепь МТЭ была

замкнута с датчиком БМ-2 и микроамперметром, перенесена в термостатируемую комнату с температурой 30°C и инкубировалась в этих условиях в течение 243 сут, после чего были отобраны промежуточные пробы на углеводороды, pH и  $E_h$  только из катодной части (чтобы не нарушать целостность МТЭ), затем система была перенесена на открытый воздух и инкубировалась в летних условиях на широте Москвы в течение последующих 30 сут.

**Полезная нагрузка МТЭ и контроль параметров анодной и катодной зон.** Подробное описание устройства датчика БМ-2 полезной нагрузки и его приемной базовой станции БС будет опубликовано отдельно, краткие характеристики устройств приведены в Дополнительных материалах. Датчик включал в себя инфракрасный детектор  $\text{CO}_2$ , детекторы температуры и влажности воздуха, а также антенну, передающую результаты измерений детекторов по радиоканалу LoRa 443 МГц на расстояние до 500 м. Питание всей системы происходило только от тока, генерируемого МТЭ, сигналы передавались по мере накопления необходимой энергии. Результаты измерений детекторов передавались на БС, подключенную к компьютеру интерфейсом Ethernet, и выводились на экран в табличном виде. Показания детекторов использовали в том числе для оценки состояния МТЭ. Ключевым измеряемым параметром было парциальное давление  $\text{CO}_2$ , детектор располагался в отверстии датчика БМ-2 на расстоянии 1 см от отверстия в крышке МТЭ (рис. 1), что обеспечивало достоверность определения содержания  $\text{CO}_2$  в газовой фазе катодной камеры топливного элемента при заданной чувствительности детектора. Параллельно с этими измерениями таким же датчиком, запитанным от стандартного химического элемента АА, в течение нескольких месяцев проводили мониторинг содержания  $\text{CO}_2$  в воздухе помещения и на местности, где инкубировался МТЭ, на высоте 1 м от пола или земли, согласно действующим санитарным нормам.

Помимо концентрации  $\text{CO}_2$  в МТЭ определяли pH и  $E_h$  анодной и катодной зон. Также отбирали пробы из этих зон для определения содержания углеводов и выделения тотальной ДНК. Эти пробы отбирали только в начале и в конце эксперимента, так как соответствующие измерения и отбор проб невозможны без нарушения целостности осадочного МТЭ. Исключение составили пробы из катодной зоны, которая была легко доступна для контроля и была опробована дополнительно, перед началом инкубирования МТЭ на открытом воздухе. Для определения углеводов отбирали: свежеприготовленную смесь почвенных проб перед ее загрузкой в МТЭ, пробу катода после отстаивания готового МТЭ без нагрузки, пробу катода перед переносом МТЭ из термостатируемой комнаты на открытый воздух, а также пробы почвы, анода и катода по окончании эксперимента.

pH и  $E_h$  измеряли портативным pH/ОВП-метром SG8 ("Mettler-Toledo") с комбинированными электродами InLab Expert Go-ISM ("Mettler-Toledo") и 301-C ("Apera Instruments", США) соответственно в анодной и катодной области после отстаивания МТЭ в разомкнутом состоянии в начале эксперимента, а также в конце эксперимента. Для доступа к анодной зоне в песчаном слое стерильной лопаткой выкапывали лунку, через которую опускали соответствующие электроды и заглубляли их в почвенный слой анодной зоны примерно на 3 см, ориентируясь по следу почвы на поверхности электрода.

**Аналитические методы.** Углеводороды в образцах почвы и электродов определяли методом холодной экстракции согласно (Anaerobic utilization of hydrocarbons..., 2020) с применением н-гексана, который добавляли к образцам и выдерживали их в течение двух дней при комнатной температуре в закрытой посуде. После сбора экстракта декантацией растворитель испаряли на ротационном испарителе при 30°C, а затем взвешивали оставшуюся сухую массу экстракта на аналитических весах с точностью до 10 мкг. Затем углеводороды разделяли на насыщенную и ароматическую фракции методом колоночной хроматографии, используя активированный силикагель в качестве сорбента. Насыщенную фракцию элюировали н-гексаном, а ароматическую — толуолом. После этого растворитель испаряли и определяли массовое содержание каждой фракции, выражаемое в процентах от массы исходного н-гексанового экстракта.

Анализ выделившихся углеводородных соединений проводили методом газо-жидкостной хроматографии с масс-селективной детекцией (ГЖХ-МС) на газовом хроматографе Agilent 8890 с детектором 5977В. В качестве газа-носителя использовали гелий с расходом 1 мл/мин. Температура испарителя, колонки и ионного источника составляли 290, 300 и 230°C соответственно. Общее время анализа составляло 102 мин, регистрацию хроматограмм проводили в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне  $m/z$  20–600.

Для идентификации углеводородов использовался программный пакет Agilent MassHunter. Нормальные и изопреноидные алканы идентифицировали по масс-фрагменту  $m/z$  71, терпаны — по  $m/z$  191, стераны — по  $m/z$  217 и 218. В ходе анализа особое внимание уделяли детекции таких биомаркеров углеводородов, как н-алканы, терпаны и стераны, что позволяло определить зрелость органического вещества и степень его биодеструкции. Соотношение трициклических и пентациклических терпанов использовали для оценки процессов биодеструкции, а соотношение диастеранов к регулярным стеранам — для определения степени трансформации органического вещества.

**Выделение ДНК, подготовка библиотек и секвенирование.** Все образцы почвы, воды и электродов отбирали в двух повторностях, экстракцию ДНК, получение библиотек и секвенирование проводили для каждой повторности отдельно. Препараты ДНК получали из образцов, отобранных из различных слоев осадочного МТЭ, с использованием набора реактивов FastDNA™ SPIN Kit for Soil ("MP Biomedicals", США) согласно инструкции производителя. Перед экстракцией ДНК влажные образцы центрифугировали из объема 1.5 мл при 13000 g 10 мин, и для дальнейшей экстракции отбирали осадок почвы или материала электродов объемом 400 мкл. Процедура экстракции ДНК из отобранных образцов включала в себя гомогенизацию твердой массы с помощью гомогенизатора FastPrep-24™ 5G ("MP Biomedicals", США), лизис клеток, удаление твердых частиц, очистку ДНК от белков, неорганических ионов и посторонних органических веществ (гуматы, полисахариды и т.п.). Концентрацию ДНК в полученных экстрактах определяли флуориметрически на Qubit 2.0 ("Invitrogen") с помощью набора реактивов dsDNA согласно инструкции производителя. Подготовку библиотек ампликонов V4 участка гена 16S рРНК проводили по описанной ранее методике (Gohl et al., 2016) с использованием пары праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3'; Hugerth et al., 2014) — Pro-mod-805R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'; Меркель и соавт., 2019). Секвенирование библиотек проводили на системе MiSeq™ ("Illumina Inc.", США) с использованием картриджа для получения парно-концевых чтений длиной 150 нуклеотидов. Параллельно с экспериментальными образцами проводили подготовку библиотек и секвенирование отрицательных контролей с дистиллированной водой. Все данные секвенирования депонированы в NCBI BioProject PRJNA1173134.

**Биоинформатические методы.** Таблицу филотипов (amplicon sequence variants, ASVs) по результатам секвенирования составляли с использованием скрипта dada2 (Callahan et al., 2016) (программный пакет R v1.30.0) с параметрами обрезки 210 п.н. как для прямых, так и для обратных чтений. Таксономическую аннотацию проводили на основе базы данных SILVA версии 138.1 (Quast et al., 2013). Статистическую обработку данных для совокупности последовательностей каждого образца вычисляли с помощью программы SeqKit v2.8.2 (табл. S1). Анализ обработанных данных проводили в среде R (версия 4.3.2) с использованием программных пакетов phyloseq (версия 1.46.0, McMurdie, Holmes, 2013), microbiome (Lahti & Shetty, версия 1.24.0) и vegan (Oksanen J. Vegan: Community Ecology Package.; версия 2.6-6.1). Роды, отнесенные к категории "Unknown", и те, у которых общая представленность была ниже 1%, были исключены

из анализа физиологического разнообразия микробных сообществ. Последовательности, полученные в отрицательных контролях, не учитывались при анализе данных, т.к. библиотеки контролей были в 50 раз меньше, чем библиотеки экспериментальных образцов, и программное удаление этого незначительного числа “посторонних” последовательностей могло ошибочно исключить из анализа более 20% целевых ASV, специфичных для экспериментальных образцов (Karstens et al., 2019).

Анализ физиологического разнообразия микробных сообществ почвы, анодной и катодной зон МТЭ проводили двумя различными способами, с использованием программного пакета PICRUSt2 (Douglas et al., 2020) и путем рутинного анализа литературных данных по физиологии представителей культивируемых таксонов, обнаруженных в исследованных микробиомах. В контексте нашей работы мы сосредоточились на анализе путей углеродного метаболизма, включая пути деградации углеводов и фиксации  $\text{CO}_2$ , а также путей внеклеточного переноса электронов, характеризующих электрокаталитическую активность микроорганизмов. Подробное описание обоих методов анализа физиологического разнообразия, использованных в нашей работе, приведено в Дополнительных материалах (раздел “Методы”).

Для сравнительного анализа филогенетического разнообразия различных элементов МТЭ использовали диаграммы Венна, построенные с помощью пакета ggVennDiagram (Package ‘ggvenn’) в среде R. Анализ бета-разнообразия проводили двумя методами — анализа главных компонент (PCA) и неметрического многомерного шкалирования (NMDS). В обоих случаях применяли метрику Брея–Кёртиса как меру несходства между выборками. Все расчеты были выполнены в среде Rstudio. Для проведения PCA была использована функция rgsomr, которая позволяет проводить анализ с центровкой и стандартизацией данных, что особенно важно при работе с разнородными наборами геномных данных. Для оценки

и визуализации вклада каждой главной компоненты в общую вариацию данных были рассчитаны доли объясненной дисперсии. Графическое представление результатов PCA было выполнено с использованием пакета ggplot2. Параллельно на той же выборке данных выполняли анализ NMDS, который, в отличие от методов ординации, делающих линейные предположения о данных (как PCA), является нелинейным методом и хорошо подходит для экологических данных, часто не соответствующих предположениям линейных методов. Анализ NMDS, а также характеристика альфа-разнообразия (расчеты индексов Чоа1, Шеннона и обратного индекса Симпсона) были выполнены в среде R (версия 4.3.2).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

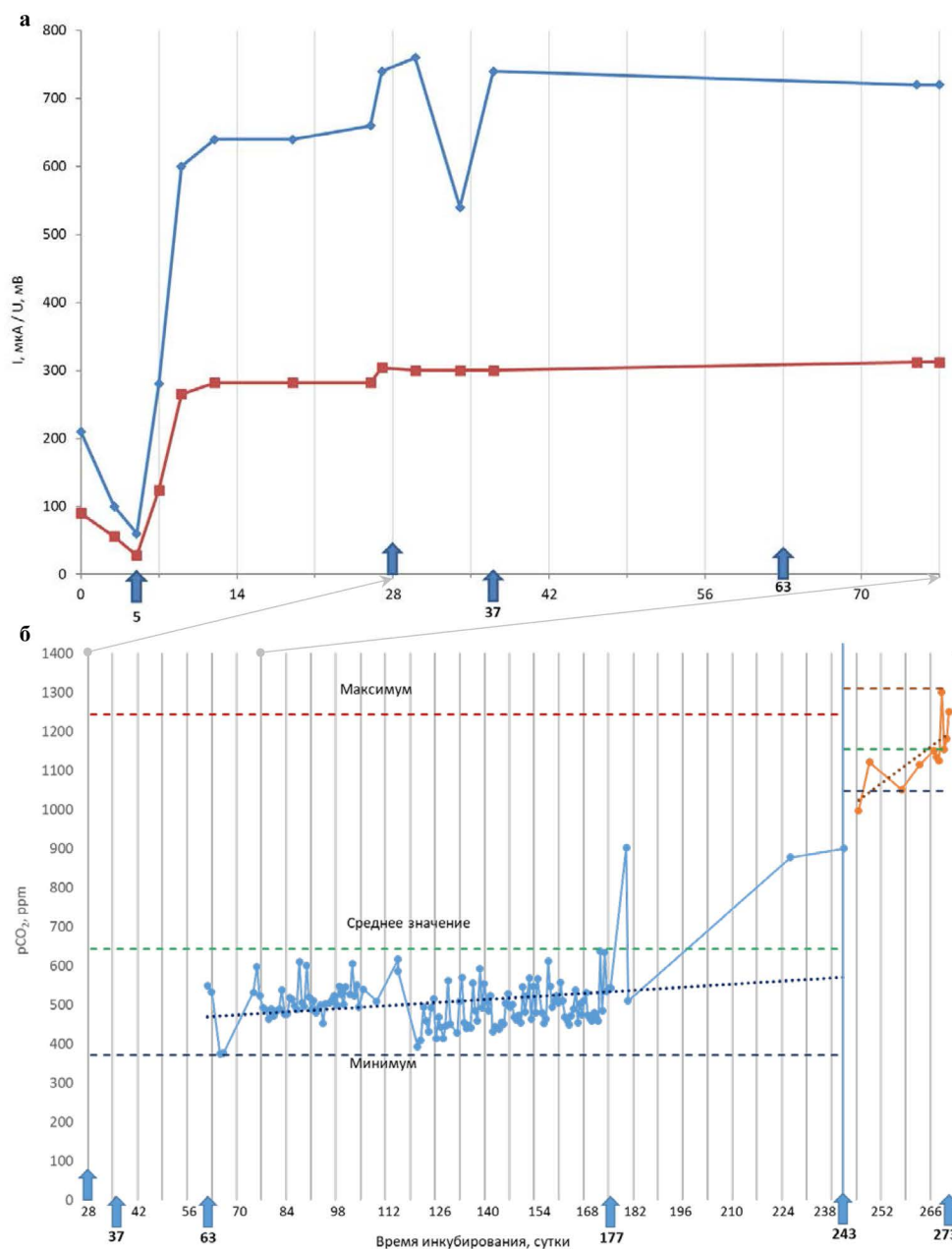
**Запуск и инкубирование осадочного МТЭ, физико-химические параметры системы.** Осадочный микробный топливный элемент был собран со смешанной пробой нефтезагрязненной почвы, отобранной в Винновской роще г. Ульяновска, в качестве анодной зоны и инокулята. Первые трое суток после сборки МТЭ был оставлен разомкнутым при комнатной температуре для слеживания слоев почвы и песка, являющегося хемоклином и разграничивающего анодную и катодную зоны, а также для формирования стабильных физико-химических параметров БЭС перед началом ее работы. В процессе сборки МТЭ, при заливке его дистиллированной водой мелкие частицы почвенной пробы и часть микрофлоры, преимущественно подвижная, попали в катодную зону МТЭ, где в процессе предварительного отстаивания системы сформировалась первичная микробная популяция катода. Через трое суток отстаивания с поверхности воды катодной зоны была удалена пленка всплывших углеводов, и были отобраны начальные пробы почвы анодной зоны и воды катодной зоны, обозначенные S0 (soil) и C0 (cathode) соответственно, для характеристики первичных

**Таблица 1.** Основные физико-химические параметры катодной и анодной зон осадочного МТЭ в ходе эксперимента

Время инкубирования	Температура, °C	Eh, мВ		pH	
		Катодная зона	Анодная зона	Катодная зона	Анодная зона
Начало инкубирования (после отстаивания МТЭ)	30	+60	–218	8.5	7.1
243 сут инкубирования	30→17*	–109	–290	9.0	7.5
273 сут инкубирования (окончание эксперимента)	12~31**	–169	–266	7.6	7.7

\*17°C — температура воздуха в начале инкубирования осадочного МТЭ на открытом воздухе (243 сут эксперимента).

\*\*12~31°C — общий диапазон колебания температуры воздуха во время работы осадочного МТЭ на открытом воздухе.



**Рис. 2.** Параметры генерируемого электрического тока и напряжения в первые 77 сут инкубирования (а) и концентрация  $\text{CO}_2$  в газовой фазе МТЭ в ходе эксперимента (б). Резкие изменения  $I$  и  $U$  между 30-ми и 40-ми сутками инкубирования на рисунке (а) соответствуют времени подключения полезной нагрузки, в том числе, детектора  $\text{CO}_2$ . Серые стрелки, соединяющие рисунки (а) и (б), указывают на временной интервал, совпадающий на обоих рисунках. На рисунке (а) голубой линией показаны изменения силы тока, красной — напряжения. На рисунке (б) голубой линией показано изменение концентрации  $\text{CO}_2$  при инкубировании в термостатируемых условиях, оранжевой — на открытом воздухе при переменной температуре. Голубая вертикальная линия указывает время смены условий инкубирования, горизонтальные пунктирные линии слева от вертикальной показывают минимальное, среднее и максимальное значения  $\text{pCO}_2$  в воздухе термостатируемого помещения за время контрольных измерений, такие же линии справа от вертикальной показывают значения  $\text{pCO}_2$  на открытом воздухе в месте установки МТЭ. На обоих рисунках синими стрелками показаны ключевые моменты эксперимента, под этими стрелками указано время инкубирования от начала эксперимента в сутках: 5 — истощение химической ЭДС, начало генерации тока; 28 — подключение датчика в цепь МТЭ; 37 — начало стабильной генерации тока на уровне 700 мкА; 63 — получение первого сигнала датчика; 177 — начало резкого повышения  $\text{pCO}_2$  по показаниям датчика; 243 — окончание термостатируемого инкубирования; 273 — окончание эксперимента. Относительная погрешность измерений по току и напряжению составляет 5%. Точечными линиями показаны линии тренда в изменении  $\text{pCO}_2$  на выходе из МТЭ.



микробных популяций, а также для определения начального содержания углеводов в различных частях МТЭ. Кроме того, были измерены начальные значения pH и  $E_h$  анодной и катодной зон (табл. 1), а также начальное напряжение МТЭ без нагрузки (ЭДС) и начальный ток короткого замыкания (рис. 2), после чего внешняя цепь МТЭ была замкнута через микроамперметр (сопротивление 450 Ом), и было начато инкубирование МТЭ в термостатируемой комнате при 30°C, которое продолжалось непрерывно 243 сут.

Измеренные значения  $E_h$  указывают, что в МТЭ перед замыканием электрической цепи и началом инкубирования сложились анаэробные условия в анодной зоне, в нефтезагрязненной почве, и аэробные условия в катодной зоне, в поверхностной воде (после удаления с нее пленки углеводов), что способствовало формированию большой разности потенциалов между электродами, достаточной для протекания между ними электрического тока. Важно отметить, что при этом в катодной зоне сформировались слабощелочные условия, тогда как почвенная анаэробная зона оставалась нейтральной на протяжении длительного периода инкубирования (табл. 1). После 243 сут инкубирования МТЭ в термостатируемых условиях был произведен следующий замер pH и  $E_h$  анодной и катодной зон, и были также отобраны пробы воды катодной зоны и самого катода для анализа изменений в микробной популяции этой части МТЭ и определения содержания углеводов (пробы были обозначены "С1"). При этом анодную зону оставили нетронутой для сохранения анаэробных условий и зоны хемоклина. После этих измерений МТЭ был перенесен на открытый воздух, на расстояние 300 м от здания лаборатории для проверки работоспособности в полевых летних условиях на широте Москвы. В таком состоянии МТЭ инкубировали еще 30 сут. Эти условия инкубирования отличались высокими суточными температурными колебаниями, которые достигали 19°C (табл. 1), а также повышенным содержанием CO<sub>2</sub> в окружающем воздухе (рис. 26) из-за близости крупных автомагистралей и газовой ТЭЦ к месту проведения эксперимента (55°41'54.59"N; 37°34'52.49"E). К началу инкубирования на открытом воздухе условия в катодной зоне стали значительно более восстановленными (–109 мВ), тогда как окислительно-восстановительный потенциал анодной зоны существенно не изменился. Тем не менее в МТЭ на протяжении последующих 30 сут сохранялась разность потенциалов, необходимая для питания полезной нагрузки. Также следует отметить, что после 243 сут инкубирования в термостате под катодом на поверхности песчаного слоя хемоклина образовались рыжеватые железистые минеральные отложения, что свидетельствует о сохранении окислительных процессов

в катодной зоне, несмотря на существенное снижение  $E_h$  в ней. При этом источником железа могли стать частицы почвы, попавшие в катодную зону при постановке эксперимента. Мощностные характеристики МТЭ длительное время сохранялись постоянными и стали снижаться после 23 сут инкубирования на открытом воздухе, и спустя еще 7 сут стабильного снижения тока и напряжения эксперимент был прекращен. Общее время инкубирования МТЭ составило 273 сут, а время работы полезной нагрузки – 210 сут (рис. 26). На момент окончания эксперимента окислительно-восстановительный потенциал и кислотность анодной и катодной зон практически сравнялись, и в катодной зоне установились анаэробные условия (табл. 1).

**Генерация электрического тока в МТЭ, питание полезной нагрузки.** После сборки и оттаивания МТЭ ЭДС системы составила 56 мВ, а ток короткого замыкания 108 мкА (рис. 2). В последующие 5 сут после замыкания цепи МТЭ на микроамперметр сила генерируемого электрического тока ( $I$ ) и напряжение ( $U$ ) снижались, вероятно, из-за снижения разности потенциалов между зонами катода и анода, вызванной установившимися различиями в физико-химических характеристиках (в первую очередь  $E_h$ ) этих зон. Таким образом, первичные значения  $I$  и  $U$  были сформированы химической ЭДС системы. После 5 сут работы осадочного МТЭ  $I$  стала увеличиваться сначала до 600 мкА, а затем достигла стабильных значений в 700 мкА, та же динамика прослеживалась и для изменения  $U$  МТЭ, установившегося на уровне 300 мВ к 28 сут инкубирования (рис. 2). После стабилизации значений  $I$  и  $U$  на уровне, достаточном для зарядки датчика БМ-2, на 28-е сут инкубирования эта полезная нагрузка была включена во внешнюю цепь МТЭ, что вызвало кратковременное снижение величины тока, которая затем восстановилась на прежнем уровне 700 мкА (рис. 2а). Плотность мощности полученного МТЭ за время его эффективной работы составила 0.2 мВт/м<sup>2</sup>. Датчик полезной нагрузки зарядился и передал первый сигнал детекторов через 35 сут после подключения (на 63-и сут инкубирования, рис. 26). В течение последующих 120 сут инкубирования МТЭ в термостатируемых условиях датчик заряжался и срабатывал каждые 23–25 ч. За это время ток и напряжение оставались постоянными, что может указывать на достижение равновесия биоэлектрохимической системой. Далее со 182-х по 243-е сут инкубирования МТЭ при постоянной температуре произошло небольшое снижение  $I$  до 500–600 мкА, что отразилось на частоте сигналов датчика (рис. 26). За время последующей работы осадочного МТЭ на открытом воздухе при переменной температуре сила тока существенно снизилась до 260 мкА. Это снижение коррелировало с уменьшением частоты сигнала датчика (рис. 26) и нивелированием разности



**Таблица 2.** Содержание углеводородов в почве и на электроде анодной зоны осадочного МТЭ

Показатель	Образцы		
	S0	S3	A3
Абсолютное содержание углеводородов, экстрагируемых гексаном, мг/г почвы/анода	4.55–5.45*	0.40	3.60
Насыщенные углеводороды, терпаны и стераны суммарно (% от всех углеводородов образца)	70	54	83
Ароматические углеводороды (% от всех углеводородов образца)	30	46	17
Изо-алканы и “нафтенный горб”, качественно, +/-	+	+	+
Соотношение трициклических терпанов к пентациклическим (t23/H30)	0.57	0.90	1.40
Соотношение диастеранов к регулярным стеранам C27	0.47	0.60	1.50

\*Приведен разброс значений по трем независимым определениям содержания углеводородов в смешанном образце почв и результатам предыдущих полевых измерений (Кулагина и соавт., 2012).

окислительно-восстановительных потенциалов между анодной и катодной зонами (табл. 1).

**Изменение содержания углеводородов в МТЭ.** Анализ начальных образцов почвы анодной зоны МТЭ (S0) показал присутствие терпанов, стеранов и гопанов. Эти же классы углеводородов были обнаружены по окончании эксперимента в пробах почвы (S3) и углеткани анода (A3). На момент окончания эксперимента соотношение трициклических терпанов к пентациклическим, а также содержание диастеранов по сравнению с регулярными стеранами оказалось ниже в почве анодной зоны по сравнению с самим анодом (табл. 2). Алканы не были обнаружены ни в одном из проанализированных образцов. Интересно, что ни в одном образце воды и углеткани катодной зоны в начале эксперимента после удаления поверхностной пленки, по окончании инкубирования в термостате, а также в конце эксперимента (образцы C0, C1, C3) углеводородных соединений вообще не было обнаружено.

**Содержание CO<sub>2</sub> в газовой фазе МТЭ.** Начиная с 63-х сут работы МТЭ, датчик полезной нагрузки измерял содержание CO<sub>2</sub> в воздухе непосредственно около вентиляционного отверстия в крышке устройства (рис. 1). В период инкубирования МТЭ в термостатируемом помещении измеряемые концентрации CO<sub>2</sub> на выходе из системы колебались вокруг средних значений pCO<sub>2</sub>, измеренных для данного помещения контрольными датчиками той же конструкции (рис. 26). Причем первые 114 сут работы датчиков, контролирующих МТЭ, их показания колебались в диапазоне 400–650 ppm, что было ниже средних значений для данного помещения. В последние 66 сут термостатируемого инкубирования измеренные концентрации CO<sub>2</sub> стали повышаться, но не превышали максимальных значений для воздуха данного помещения. Это повышение могло быть связано с сезонными колебаниями pCO<sub>2</sub> в воздухе Москвы. Действительно, с началом инкубирования МТЭ на открытом

воздухе в летний период (243–273 сут инкубирования; рис. 26) концентрация CO<sub>2</sub> на выходе из системы колебалась уже в диапазоне значений 998–1310 ppm, но при этом не выходила за пределы содержания CO<sub>2</sub> в окружающем воздухе в месте установки МТЭ (1049–1310 ppm; рис. 26).

**Состав микробных популяций исходной почвы, анодной и катодной зон МТЭ.** В связи с тем, что все компоненты МТЭ, кроме почвы, были изначально стерильны, в качестве исходных микробных сообществ мы рассматривали 2 совокупности микроорганизмов, сложившиеся после сборки и отстаивания МТЭ, а именно микробную популяцию смешанной почвенной пробы, заложенной в анодную зону, и популяцию воды катодной зоны. В обоих случаях источником микроорганизмов была смешанная почвенная проба, взвешенная часть которой попала в катодную зону при заливке МТЭ водой (см. раздел “Материалы и методы исследования”). Каких-либо различий в микробных сообществах почвы и собственно анодного материала в начале эксперимента не существовало, они ожидаемо появились в процессе инкубирования, когда адсорбция микробных клеток на аноде и его использование в качестве акцептора электронов стали дополнительным фактором селекции. Микробное сообщество катодной зоны изменялось изолированно от сообществ почвы и анода; кроме того, катодная зона и сам катод были доступны для отбора проб в процессе инкубирования без нарушения целостности МТЭ, поэтому для микробной популяции катодной зоны был получен дополнительный филогенетический профиль на 243-е сут инкубирования, перед переносом МТЭ на открытый воздух и началом его инкубирования при переменной температуре.

Кривые разрежения для совокупностей последовательностей фрагментов генов 16S рРНК каждого из проанализированных образцов достигали плато, причем для каждой из биологических

повторностей (Дополнительные материалы, рис. S1), что позволило использовать результаты филогенетического профилирования в последующем анализе. Существенные различия в структуре микробных сообществ почвы, анодной и катодной зон МТЭ по окончании инкубирования видны уже на уровне филумов. Каждое из проанализированных сообществ включало 5–7 доминирующих филумов (с представленностью  $\geq 2\%$ ), из которых *Pseudomonadota* и *Actinomycetota* присутствовали во всех проанализированных пробах, причем *Pseudomonadota* были наиболее представленной группой во всех микробных популяциях, кроме анодной в конце эксперимента. В катодной популяции к концу эксперимента *Pseudomonadota* абсолютно доминировали, достигая представленности  $>90\%$  (рис. 3а).

За время работы МТЭ проявились различия в микробных популяциях почвы и собственно рабочего анода. В обеих популяциях существенно увеличилась представленность *Thermodesulfobacteriota*, *Bacillota*, *Chloroflexota*, *Spirochaetota*. Причем в анодной наибольшую долю составили *Desulfobacterota*, чуть менее представленными были *Pseudomonadota* и *Bacillota*, и из всех проанализированных проб максимальная представленность *Bacillota* наблюдалась также в анодной популяции к концу эксперимента (рис. 3а).

Рассмотрение филогенетического разнообразия микробных популяций на уровне доминирующих семейств и родов, представленность которых превышала 1%, выявило более существенные различия микробных сообществ МТЭ. Так, доминирующий филум *Pseudomonadota* в исходной почве оказался представлен главным образом родами *Sulfuritalea* и *Immundisolibacter*, в конце эксперимента представленность этих таксонов в почве снизилась, но возросла доля *Pseudoxanthomonas*. На аноде также произошло существенное снижение доли *Sulfuritalea* и *Immundisolibacter*, но увеличилась представленность *Parvibaculum*. Напротив, представительство *Pseudomonadota* в исходной микробной популяции катода было разнообразным и включало в себя бактерии родов *Caulobacter*, *Parvibaculum*, *Brevundimonas*, в меньшей степени *Pseudomonas*, однако в процессе инкубирования именно псевдомонады оказались абсолютными доминантами в катодной микробной популяции (рис. 3б).

Следует также отметить значительную долю бактерий рода *Methyloversatilis* филума *Pseudomonadota* в катодной популяции по окончании термостатного инкубирования МТЭ (проба С1), которые практически элиминировались из катодного микробного сообщества после инкубирования на открытом воздухе при переменной температуре. Филум *Thermodesulfobacteriota* был главным образом представлен в исходной почве бактериями родов *Geobacter* и *Citrifermentans*, а в почве

по окончании эксперимента – родом *Desulfoprimum*. Напротив, на аноде существенное увеличение доли *Thermodesulfobacteriota* произошло из-за увеличения представленности родов *Geobacter*, *Citrifermentans*, *Syntrophus* и некультивируемых представителей семейства *Geobacteraceae* по сравнению с их представленностью в исходной почве, загруженной в анодную зону МТЭ. Филум *Bacillota* был представлен в конечных пробах почвы 8-ю минорными таксонами, а в анодной популяции – в основном, филотипами рода *Thermincola* и некультивируемых групп клостридий, составлявшими минорную часть микробного сообщества исходной почвы. Актиномицеты, доля которых была существенно увеличенной в микробных популяциях почвы в конце инкубирования и катода по окончании термостатируемого режима, были представлены некультивируемыми таксонами семейства *Microbacteriaceae* и порядка *Gaiellales* в почве и бактериями рода *Pseudonocardia* на катоде. К концу инкубирования псевдомонады на катоде практически отсутствовали. Следует также отметить снижение представленности родов *Rhizobacter* и *Sandaracinobacter* в микробиоме почвы и, наоборот, заметное увеличение доли представителей порядка *Anaerosomatales* в почве и на аноде за время инкубирования (рис. 3б).

Сравнение состава микробных сообществ с помощью диаграмм Венна подтверждает существенные различия начальных микробных популяций анодной и катодной зон, имеющих между собой лишь 12 общих доминирующих филотипов при 6 и 14 уникальных для каждой из популяций. Сходство наблюдается в составе микробных популяций почвы и анода в конце инкубирования, однако последний содержит 9 уникальных доминирующих филотипов и еще 6 филотипов, представленных в начальных микробных популяциях, но не представленных в почве на момент окончания инкубирования МТЭ (Дополнительные материалы, рис. S2а). Сравнение микробных популяций катода с помощью диаграмм Венна выявило существенное отличие их состава по окончании обоих этапов инкубирования от начального, а также существенное отличие конечной катодной популяции от той, которая сложилась после термостатного инкубирования МТЭ (в конечной популяции было 9 уникальных доминирующих таксонов, тогда как в промежуточной – всего один такой таксон; Дополнительные материалы, рис. S2б).

**Расчеты альфа- и бета-разнообразия микробных популяций МТЭ.** Кластерный анализ бета-разнообразия двумя различными методами, ординации РСА и неметрическим NMDS, выявил одинаковые закономерности в изменении микробных популяций МТЭ в процессе инкубирования, а также существенные различия исходных популяций почвы анодной зоны и воды катодной зоны. Оба метода выявили также существенное изменение микробных популяций

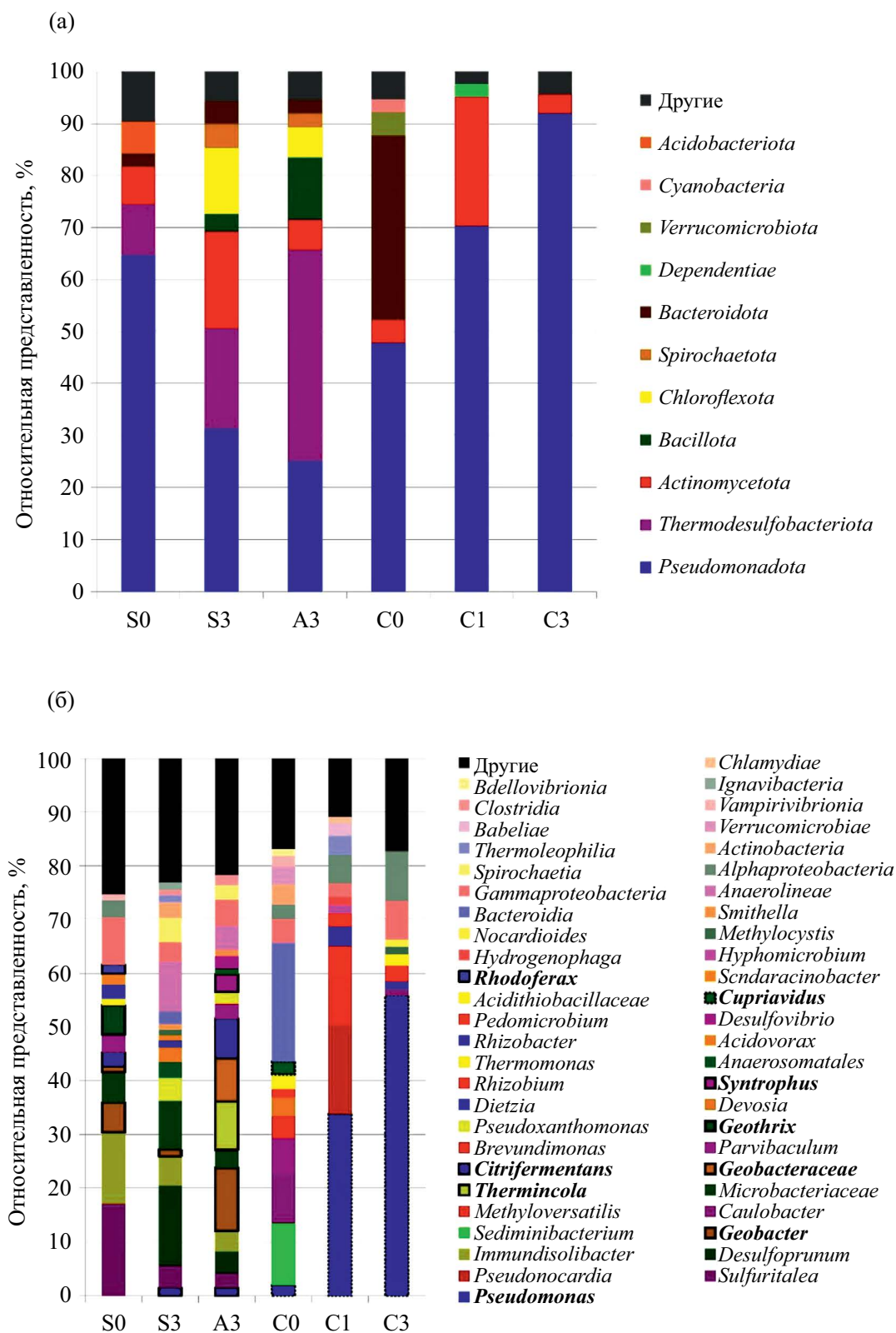


Рис. 3. Структура микробных популяций нефтезагрязненной почвы, анода и катода МТЭ по результатам профилирования по гипервариабельному участку V4 гена 16S рРНК на уровне филумов (а), семейств и родов (б). На гистограммах приведены таксоны с представленностью  $\geq 1\%$ , на рисунке (б) некоторые таксоны с представленностью 1–5% объединены до уровня семейств и порядков для удобства отображения.

по составу в процессе инкубирования. Популяции анода и почвы анодной зоны к концу эксперимента не только сильно разошлись с исходным микробным сообществом почвы, но и стали существенно различаться между собой (Дополнительные материалы, рис. S3), что свидетельствует о роли анода, используемого в качестве акцептора электронов, как селективного фактора. Существенно изменились и популяции катода в процессе инкубирования относительно исходного инокулята катодной зоны. Ожидаемо, что микробные популяции катода в конце инкубирования в термостатируемом режиме (C1) и после инкубирования на открытом воздухе (C3) были наиболее близки друг к другу (Дополнительные материалы, рис. S3a). Метод РСА также выявил, что разнообразие почвенных образцов осталось достаточно широким в процессе инкубирования. Такое же широкое разнообразие характеризует и микробную популяцию, сложившуюся на аноде. Напротив, катодная популяция, изначально менее разнообразная, претерпела дальнейшее уменьшение бета-разнообразия в процессе инкубирования МТЭ (Дополнительные материалы, рис. S3б), что коррелирует с абсолютным доминированием одного фило типа рода *Pseudomonas* на катоде к концу эксперимента (рис. 3б).

Результаты расчетов альфа-разнообразия подтверждают изменения микробных популяций различных зон МТЭ, выявленные кластерным анализом (Дополнительные материалы, рис. S3). Так, расчеты индекса Шеннона показывают более высокое разнообразие почвенных и анодных микробных популяций по сравнению с популяциями катода в конце эксперимента. Более того, расчеты обратного индекса Симпсона и индекса Чоу1 подчеркивают увеличение альфа-разнообразия в почвенной и анодной популяциях по сравнению с исходной популяцией почвы и ярко выраженную обратную тенденцию изменения разнообразия микробной популяции катодной зоны МТЭ (табл. 3). Интересно, что расчеты альфа-разнообразия выявили наибольшее разнообразие в микробной популяции анода — из всех проанализированных проб.

**Характеристика физиологического разнообразия микробных популяций МТЭ.** Анализ

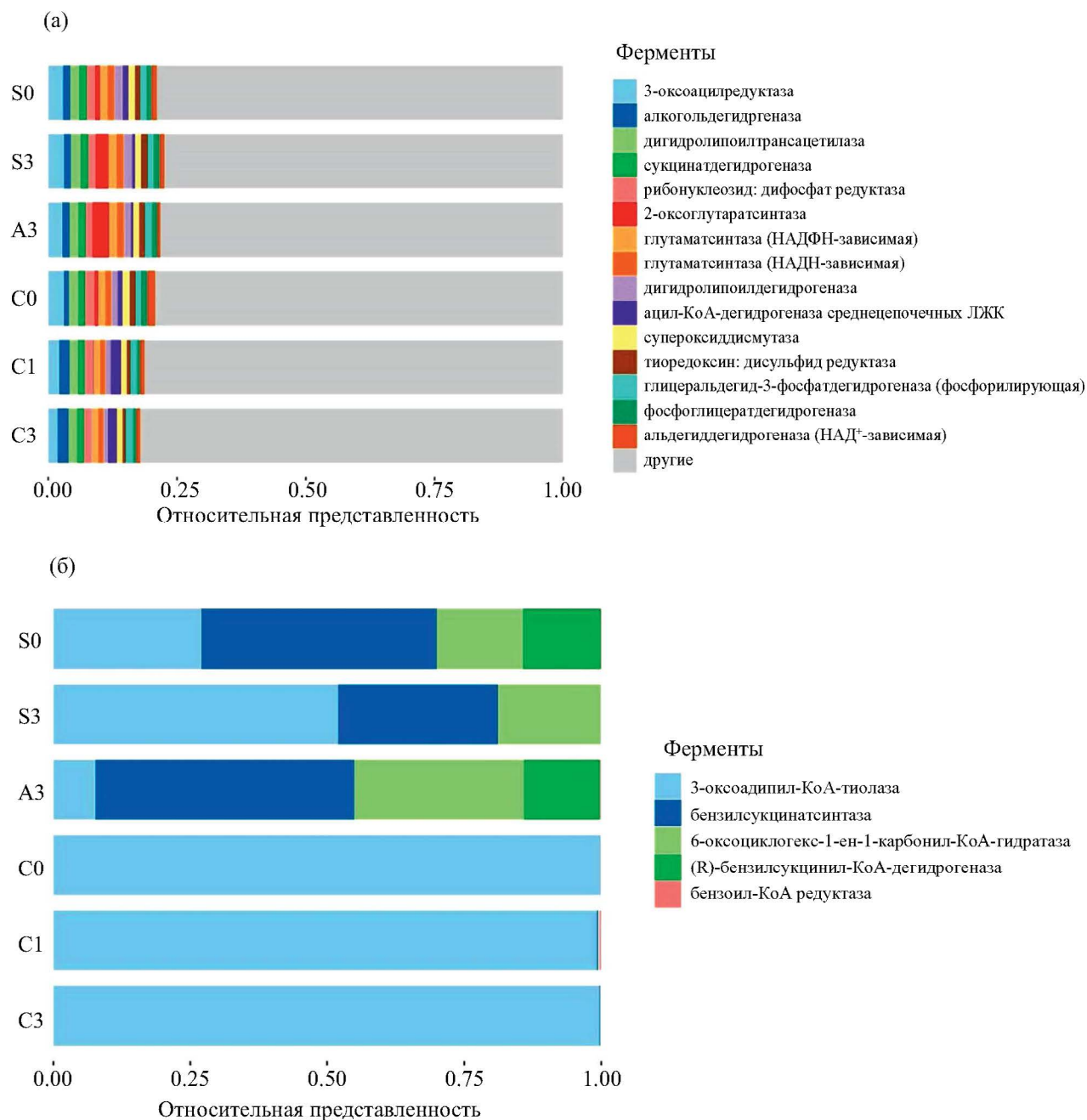
метаболических возможностей микробных популяций МТЭ по геномным характеристикам выявленных в них фило типов с помощью PICRUSt2 не выявил существенных различий в предполагаемой представленности ключевых ферментов углеводного метаболизма, включая основные классы трансфераз, оксидоредуктаз, гидролаз, лиаз, лигаз, изомераз, участвующих в путях потребления наиболее распространенных органических субстратов. Ни для одной проанализированной популяции не были выявлены ASV, родственные организмам, способным к автотрофной фиксации CO<sub>2</sub> или метаногенезу/метанотрофии. Однако более подробный анализ оксидоредуктаз выявил существенное увеличение предполагаемой представленности 2-оксоглутаратсинтазы в микробных популяциях почвы и анода в конце эксперимента (рис. 4а). Данный фермент является одним из ключевых в цикле трикарбоновых кислот, и его повышенная представленность может свидетельствовать о наиболее активном потреблении органики, сопряженном с дыхательными процессами. Кроме того, анализ предполагаемой представленности ферментов деградации углеводов показал, что в популяциях почвы и анода микроорганизмы, способные к анаэробному окислению углеводов, могли быть представлены шире, чем в катодной популяции (рис. 4б).

Анализ литературных данных по метаболизму микроорганизмов, наиболее близкородственных обнаруженным фило типам, выявил следующие особенности микробных популяций МТЭ. В анаэробной зоне в нефтезагрязненной почве были значительно представлены потенциальные углеводород-окисляющие бактерии, причем некоторые из них могут быть способны и к окислению нерастворимых форм Fe(II), и к электрогенезу. Также в исходной почве присутствовали и потенциальные органотрофные электрогены (рис. 5а).

За время эксперимента доля потенциальных углеводородокисляющих микроорганизмов в почве почти не изменилась, зато существенно снизилась доля потенциальных электрогенов, но появилась значимая доля железоредукторов, также возросла доля органотрофов. На аноде по завершении работы

**Таблица 3.** Характеристика альфа-разнообразия микробных популяций осадочного МТЭ

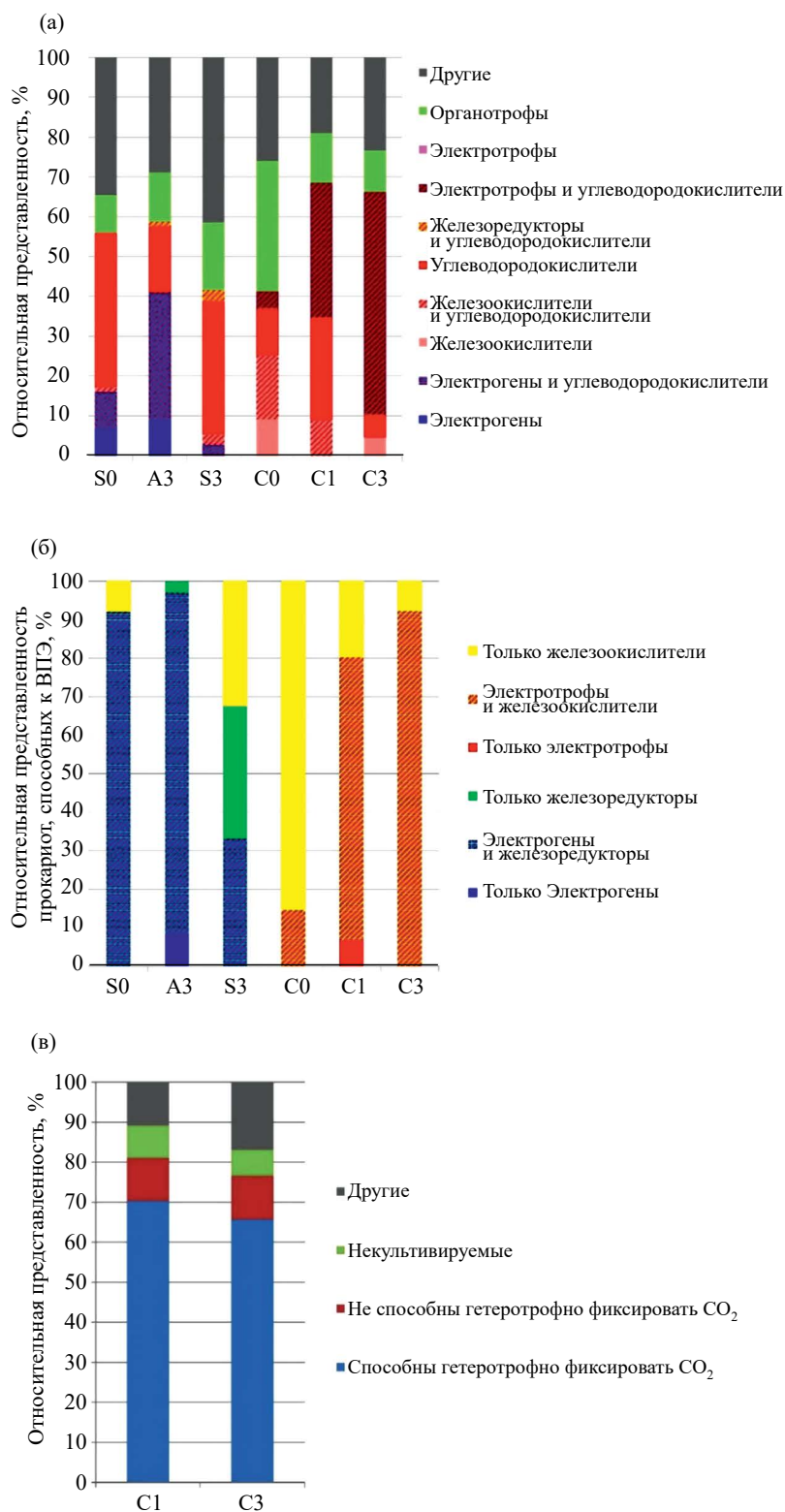
Популяция (зона МТЭ)	Индексы альфа-разнообразия		
	Чоу1	Обратный Симпсона	Шеннона
S0 (исходная почва)	116	10.92	3.21
C0 (исходная катодная зона)	75	11.20	3.01
S3 (почва в конце эксперимента)	114	12.83	3.37
A3 (анод в конце эксперимента)	111	19.73	3.54
C1 (катод к концу термостатирования)	71	5.52	2.42
C3 (катод в конце эксперимента)	73	2.67	2.09



**Рис. 4.** Различия в представленности потенциальных носителей генов оксидоредуктаз (а) и генов, детерминирующих анаэробное окисление углеводов (б) в микробных популяциях МТЭ в начале (S0, C0) и в конце инкубирования (S3, A3, C1, C3) по результатам анализа PICRUSt2.

осадочного МТЭ доля потенциальных электрогенов, наоборот, значительно увеличилась. Причем большинство потенциальных электрогенов, накопившихся на аноде, также может окислять и углеводороды. В исходной микробной популяции катода следует отметить меньшую, по сравнению с почвой, долю потенциальных углеводородокисляющих бактерий, существенную представленность

потенциальных железоокисляющих бактерий, наличие потенциальных электротрофов и отсутствие электрогенов и наибольшую представленность органотрофов, потребляющих простые органические субстраты. Следует отметить, что в процессе инкубирования доля потенциальных электротрофов в катодной популяции возрастала и достигала максимума к концу эксперимента. Потенциальные



**Рис. 5.** Физиологические группы в микробных популяциях МТЭ, предсказанные на основании анализа литературных данных по культивируемым микроорганизмам, наиболее близкородственным обнаруженным филотипам: а – все целевые физиологические группы; б – соотношение различных групп микроорганизмов, способных к внеклеточному переносу электронов; в – представленность микроорганизмов, способных к гетеротрофной фиксации CO<sub>2</sub>, в катодной популяции. При анализе рассматривали только доминирующие фило типы с представленностью ≥1%. Группы, имеющие несколько целевых метаболических свойств, показаны штриховкой по соответствующим цветам.

электротрофы были представлены всего одним филотипом семейства *Pseudomonadaceae*, наиболее близкородственным виду *Stutzerimonas stutzeri*, представители которого также способны окислять углеводороды.

Интересно, что четыре рассмотренные нами физиологические группы микроорганизмов, способных к внеклеточному переносу электронов, а именно: железоредукторы, электрогены, железоокисляющие микроорганизмы и электротрофы, не всегда совпадали друг с другом (рис. 5б). За время инкубирования МТЭ на аноде накопились две небольшие узкоспециализированные группы потенциальных электрогенов и железоредукторов, которые не совпадали между собой по филогенетическому составу. В почве произошло накопление отдельных групп потенциальных железоредукторов и железоокислителей, тогда как доля потенциальных электрогенов, обладающих железовосстанавливающей активностью, уменьшилась. В катодной популяции, наоборот, произошло существенное уменьшение доли узкоспециализированной группы железоокислителей и увеличение группы электротрофов, способных также к окислению минералов железа (рис. 5б).

В связи с отсутствием повышенных концентраций  $\text{CO}_2$  в газовой фазе МТЭ (рис. 2б), наличием в топливном элементе большого количества органического вещества и потенциальных органотрофов (рис. 5а) и отсутствием микроорганизмов, способных к автотрофной фиксации  $\text{CO}_2$ , мы подробно рассмотрели наличие в поверхностной, катодной микробной популяции микроорганизмов, способных к гетеротрофной фиксации неорганического углерода. Этот процесс может быть единственным возможным путем потребления углекислого газа, образующегося в результате активного окисления органики в МТЭ. Результаты литературного анализа показали, что подавляющее большинство филотипов, обнаруженных на катоде, имеют близкородственные микроорганизмы, способные гетеротрофно фиксировать  $\text{CO}_2$  (рис. 5в).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее перспективными по производительности и удобству применения считаются МТЭ, в которых используются природные или антропогенные микробные сообщества, сложившиеся в осадочных местах обитания (см. обзоры Chen et al., 2020; Lovley, Holmes, 2021 и ссылки в них). В созданном нами осадочном МТЭ мы решили совместить элемент электропитания системы контроля параметров окружающей среды (температуры, влажности воздуха, концентрации  $\text{CO}_2$ ) с устройством для очистки нефтезагрязненной почвы. Описанная в настоящее время стимуляция

электроактивности природных микробных сообществ для очистки осадочных экосистем по методике “electro snorkel” подразумевает использование проводящих материалов для обеспечения доступа анаэробных микроорганизмов, развивающихся в толще осадка, к высокопотенциальному акцептору электронов кислороду через внеклеточный перенос электронов к проводящему материалу, а от него — на кислород в поверхностной влажной среде (Erable et al., 2011). Преимуществом такой методики для биоремедиации считается отсутствие необходимости механического перемешивания больших объемов загрязненной почвы для обеспечения доступа воздуха к углеводородоокисляющим микроорганизмам и стимуляция вместо этого анаэробных процессов биodeградации без нарушения целостности почв/грунтов (Roginska et al., 2021). Однако до настоящего времени устройства, в которых реализуется принцип “electro snorkel”, не рассматривались как полноценные источники тока. В нашей работе мы получили устройство, которое в течение 210 сут прослужило непрерывным источником питания автономного датчика атмосферных параметров и обеспечивало деградацию углеводородов в нефтезагрязненной почве с низким выходом парникового газа  $\text{CO}_2$ . Топливный элемент был создан на основе смешанной пробы почвы, которая уже более 50 лет подвергается нефтезагрязнению из неутонченного источника топливных углеводородов. Таким образом, в полученном МТЭ был испытан способ очистки сильно загрязненной почвы, представляющей серьезную экологическую проблему. Осадочный МТЭ представлял собой подобие колонки Виноградского и, в отличие от классического варианта этой экспериментальной модели, был непрозрачным и большую часть времени работы инкубировался в темном помещении. Однако вертикальный градиент окислительно-восстановительного потенциала способствовал формированию отличных друг от друга анаэробной (анодной) и аэробной (катодной) зон, разделенных зоной хемоклина (рис. 1), в которых сложились различные по филогенетическому и физиологическому разнообразию микробные популяции с повышенной представленностью потенциальных электрогенных и электротрофных микроорганизмов соответственно. Физико-химические и микробиологические различия сформировавшихся анодной и катодной зон способствовали возникновению разности потенциалов между ними и длительной генерации электрического тока. Перемещение осадочного МТЭ на открытый воздух было необходимо для проверки его работоспособности в полевых условиях и помогло выявить влияние больших суточных температурных колебаний ( $19^\circ\text{C}$ ) и повышенного содержания  $\text{CO}_2$  в окружающем воздухе на работу устройства и состав его микробных популяций.



Длительная (с 37-х по 273-и сут) и стабильная генерация электрического тока силой 700 мкА и напряжением 300 мВ показала возможность использования осадочных МТЭ с нефтезагрязненными почвами средней полосы России для питания автономных контрольно-измерительных устройств (рис. 2), прежде всего метеорологического назначения. Тем не менее в конструкции МТЭ, вероятно, имелась проблема недостаточной вентиляции катодного пространства, которая привела к снижению  $E_h$ , а значит и разности потенциалов между анодом и катодом, за время термостатируемого инкубирования (табл. 1). Эта проблема наиболее отчетливо проявилась и снизила эффективность использования устройства при смене условий его инкубирования и появлении сильных температурных колебаний. Так, по окончании инкубирования МТЭ на открытом воздухе произошло нивелирование различий окислительно-восстановительного потенциала и pH между анодной и катодной зонами, которое привело к резкому падению напряжения между электродами. Это могло быть вызвано активной циркуляцией воды внутри осадочного МТЭ в результате процесса конвективного перемешивания, вызванного большими суточными колебаниями температуры. Так как созданный осадочный МТЭ состоял из слоев, различающихся по составу (почва, песок, углеткань) и, как следствие, по теплоемкости и теплопроводности, при резких колебаниях температуры между слоями не устанавливалось теплового равновесия (в отличие от условий в термостате), что и приводило к вертикальному перемещению воды, активному массообмену между слоями и изменению окислительно-восстановительных условий и кислотности анодной и катодной зон.

Второй причиной резкого снижения эффективности работы МТЭ к концу эксперимента могло быть увеличение в почвенной микробной популяции доли *Thermodesulfobacteriota* (рис. 3а) и, в частности, бактерий родов *Desulfoprimum*, *Desulfomonile*, *Desulfovirga*, *Desulfovibrio* (рис. 3б). Большинство представителей этих родов является сульфатредукторами, основной метаболит которых, сульфид, мог мигрировать вверх в аэробную катодную зону и формировать там более восстановленные условия. Причем этот процесс мог существенно усиливаться за счет конвективного переноса. Данная проблема выявлена как серьезное ограничение практическому применению МТЭ в полевых условиях впервые и требует дальнейшего технического решения. Следует отметить, что в большинстве опубликованных ранее работ по практическому применению осадочных МТЭ эти устройства размещали либо в помещениях с постоянной температурой, либо в полевых условиях тропического или субтропического климата, либо в морских осадках (см. обзор Lovley, Holmes, 2021 и ссылки в нем).

Все эти условия характеризуются гораздо большей температурной стабильностью, чем почвы умеренных широт, которые, как показал наш опыт, даже в летний период испытывают значительные температурные колебания.

С самого начала эксперимента нефтезагрязненная почва являлась основным источником микроорганизмов для всех компонентов осадочного МТЭ, однако в силу различий условий между анаэробной и аэробной зонами (содержание кислорода, концентрация и состав органического вещества, общая численность микроорганизмов и др.) их бактериальные сообщества уже спустя сутки после сборки осадочного МТЭ стали существенно друг от друга отличаться (рис. 3, S4). Спустя несколько суток после сборки осадочного МТЭ между микробными популяциями анодной почвы и воды катодной зоны осталось только 12 общих доминантных таксонов из 48 (рис. S4а), среди которых были бактерии родов *Parvibaculum*, *Thermomonas* и некультивируемый представитель класса *Gammaproteobacteria* (рис. 3б). При этом, в целом, исходные микробные популяции анодной и катодной зон имели достаточно высокое биоразнообразие, схожее при его цифровой оценке (рис. S3б, табл. 3). В процессе работы МТЭ различия между микробными популяциями его анодной и катодной зон, а также между популяциями почвы и собственно анода, увеличились (рис. 3, S2, S3), что указывает на действие в каждой зоне одного или нескольких селективных факторов. При этом в микробных популяциях почвы и анода произошло увеличение биоразнообразия, тогда как разнообразие катодной популяции постепенно снижалось (рис. S3б, табл. 3).

Одним из наиболее важных результатов было селективное накопление в микробных сообществах анода и катода потенциальных электроактивных бактерий (рис. 3, 5а, 5б), многие из этих организмов присутствовали в исходной почве в минорных количествах. Причем в анодной популяции были представлены только потенциальные электрогены и железоредукторы, тогда как в катодной — только потенциальные электротрофы и железоокисляющие бактерии (рис. 5а). Доминирующие на аноде электрогены были представлены 5 таксонами: родами *Geobacter*, *Citri fermentans*, *Thermincola*, *Pseudomonas*, *Syntrophus*. Суммарная доля электрогенов в сообществе анода составила 41%. В катодной микробной популяции, наоборот, накопленные потенциальные электроактивные организмы оказались представлены одним доминирующим филотипом, родственником *Stutzerimonas stutzeri* (рис. 3б, 5а). Селективное накопление электроактивных бактерий на электродах свидетельствует о формировании типичных для биоэлектрохимических систем микробных популяций и подтверждает, что именно биологические

процессы, а не химическая разность потенциалов между анодной и катодной зонами, были источником электрической энергии в системе.

Важно отметить, что большая часть потенциальных электроактивных бактерий, как на аноде, так и на катоде, была способна к окислению углеводов (рис. 5). Согласно анализу PICRUSt2 таксоны анодной популяции имели ближайших родственников с наибольшей представленностью генов анаэробной деградации углеводов (рис. 4б).

Результаты анализа состава углеводов почвы, анода и катода до и после эксперимента подтверждают процессы деградации этих соединений при работе МТЭ. Это особенно проявилось при сравнении характеристик гексановых экстрактов почвы в начале и конце эксперимента (табл. 2). Важным отличием почвы и анода в конце эксперимента стало заметное уменьшение относительного содержания насыщенных углеводов в составе экстракта почвы, что может быть обусловлено большей устойчивостью ароматических углеводов к микробиологическому окислению по сравнению с алканами и нафтенами. Увеличение содержания ароматики относительно насыщенных углеводов служит индикатором деструкции последних (Фёдорова и соавт., 2017). В экстракте анода содержание ароматических углеводов, наоборот, значительно уменьшилось, что могло бы свидетельствовать о накоплении насыщенных углеводов на углеткани анода и отсутствии процессов нефтедеструкции на нем. Однако увеличение в ходе эксперимента соотношения трициклических терпанов к пентациклическим (t23/H30) и диастеранов к регулярным стеранам C27, наиболее заметное на аноде, свидетельствует о протекании нефтедеструкции и в микробном сообществе электрода, так как стераны и терпаны являются наиболее устойчивыми к биodeградации насыщенными углеводородами (Peters, Moldowan, 1993). Пониженное содержание ароматических углеводов на аноде может указывать на более интенсивную деструкцию именно этих соединений электрогенным сообществом, что коррелирует с накоплением на аноде представителей рода *Geobacter*, для которых показано совмещение окисления ароматических углеводов с внеклеточным переносом электронов на железо (Lovley et al., 2004). Отсутствие алканов во всех проанализированных пробах может быть индикатором происхождения углеводов в нефтезагрязненной почве. Предполагается, что этим источником является не разлив сырой нефти, а разлив смеси топлив, долгое время находившихся в подземной линзе (Кулагина и соавт., 2012). Отсутствие детектируемых количеств углеводов на катоде за все время инкубирования можно объяснить действием зоны песчаного хемоклина, которая препятствует проникновению большей части

углеводородов в катодную зону, а также высокой эффективностью нефтедеструкторов катодной популяции, способной эффективно окислять небольшие количества углеводов, просачивающиеся через толщу песка в катодную зону. В целом, результаты анализа углеводов на аноде и в почве МТЭ коррелируют с накоплением потенциальных углеводородоокисляющих микроорганизмов в микробных популяциях обеих этих зон и указывают на возможность стимуляции деструкции нефти микробным почвенным сообществом за счет формирования биоэлектрохимической системы и стимуляции внеклеточного переноса электронов в сообществе.

Интересно отметить разделение по составу микробных популяций нефтезагрязненной почвы и анода к концу эксперимента. Если на аноде накопились электрогенные микроорганизмы, потенциально способные и к разложению углеводов, то в почве доля потенциальных электрогенов существенно снизилась, а доля углеводород-окислителей возросла (рис. 5). В частности, в почвенной популяции накопились представители родов *Desulfoprunum*, *Immundisolibacter*, *Sulfuritalea*, *Pseudoxanthomonas*. Таким образом, к концу работы осадочного МТЭ, несмотря на совместное нахождение нефтезагрязненной почвы и анода в анаэробной зоне, в них сложились разные селективные условия: электрогенные бактерии тяготели к аноду, а углеводородоокислители лучше развивались именно в почве. В таких условиях в системе мог сформироваться эффективный механизм межвидового переноса электронов от углеводородоокисляющих микроорганизмов в толще почвы к электрогенам, развивающимся на электроде, потребляющим более легкую фракцию органического вещества в системе и передающим высвобождаемые электроны непосредственно в электрическую цепь МТЭ. С этим предположением коррелирует селективное накопление потенциальных железоредукторов в почве (рис. 5б), тогда как на аноде среди микроорганизмов, способных к внеклеточному переносу электронов (ВПЭ), накапливались те, которые способны как к электрогенезу, так и к железоредукции. Кроме того, PICRUSt-анализ вероятной представленности оксидоредуктаз в микробных популяциях МТЭ выявил увеличение доли одного из ключевых ферментов ЦТК в популяциях почвы и анода, что косвенно свидетельствует о возможном преобладании именно дыхательных, а не бродильных процессов в этих зонах, а именно с дыхательными процессами, как правило, сопряжены механизмы ВПЭ (Shi et al., 2015).

В микробной популяции катода в процессе работы осадочного МТЭ разнообразие электроактивных бактерий уменьшалось по сравнению с исходным сообществом катода, но увеличивалась их относительная представленность (рис. 3, 5). Большая доля бактерий семейства *Pseudomonadaceae* к концу

эксперимента в катодной зоне, когда там установились восстановительные условия (табл. 1), может быть обусловлена факультативным анаэробизмом псевдомонад и быстрым переключением их метаболизма в зависимости от условий среды. Другие микроорганизмы в популяции могли не выдержать конкуренции с псевдомонадами при резком изменении условий среды с началом инкубирования МТЭ при переменной температуре и последующего конвекционного перемешивания водной фазы анодной и катодной зон. Тем не менее особые селективные условия сформировались в катодной зоне, по-видимому, еще на стадии термостатируемого инкубирования МТЭ, о чем говорит увеличение за этот период в катодной популяции доли бактерий, способных как к электротрофии, так и к окислению углеводов (рис. 5а). При термостатируемом инкубировании в катодной популяции отдельно обозначилась группа потенциальных электротрофов, не способных одновременно к окислению железа (рис. 5б), которая элиминировалась при последующем инкубировании МТЭ в нестабильных условиях и изменении параметров катодной зоны.

Следует отметить, что в микробном сообществе исходной нефтезагрязненной почвы среди доминантов не удалось обнаружить бактерии, потенциально способные к электротрофии, хотя электрогены имели в нем высокую представленность (рис. 3, 5). Вероятно, в исходной почве, относящейся к типу выщелоченных черноземов (по месту отбора проб; Атлас почв Российской Федерации), процессы межвидового переноса электронов не были активны, и основной экологической ролью микроорганизмов, способных к ВПЭ, было восстановление железо-марганцевых минералов, которые встречаются в составе почв этого типа. Возможная причина низкой выраженности межвидового переноса электронов в исходной нефтезагрязненной почве заключается в недостаточном количестве проводящих электроны материалов, в частности, минералов Fe(II), таких, как магнетит, и значительное количество электроизолирующих тяжелых углеводов. С учетом этого очевиднее становится эффект стимуляции деградации углеводов за счет активизации в почве механизмов ВПЭ путем связывания анаэробного микробного сообщества с высокопотенциальным акцептором электронов кислородом посредством системы электродов МТЭ.

При работе в условиях постоянной температуры осадочный МТЭ продемонстрировал низкий выход углекислого газа, несмотря на высокое изначальное содержание в почве углеводов и широкую представленность в исходном почвенном микробном сообществе потенциальных нефтедеструкторов. Содержание  $\text{CO}_2$  в газовой фазе, выходящей из вентиляционных отверстий МТЭ, колебалось ниже или около средних значений  $\text{pCO}_2$  в воздухе

термостатируемого помещения, измеренных таким же датчиком (рис. 2б). Большее содержание  $\text{CO}_2$  и тренд на его увеличение были зафиксированы при инкубировании МТЭ на открытом воздухе (рис. 2б). Однако и в этом случае  $\text{pCO}_2$  на выходе МТЭ колебалось в пределах контрольных измерений содержания этого газа в окружающем воздухе, которое оказалось повышенным, что характерно для промышленных зон Москвы (Губернский и соавт., 2014), в одной из которых проводились наши работы. Таким образом, происходившие в МТЭ процессы нефтедеструкции не приводили к какому-либо существенному выходу  $\text{CO}_2$ , заметному на фоне окружающего воздуха. В связи с тем, что нам не удалось выявить в какой-либо из исследованных микробных популяций микроорганизмов, способных к автотрофной фиксации  $\text{CO}_2$ , единственной причиной низкого выхода этого газа при активных процессах нефтедеструкции в МТЭ могут быть процессы гетеротрофной фиксации  $\text{CO}_2$ , в первую очередь, в поверхностном, катодном микробном сообществе. Действительно, мы выявили, что большая часть доминирующих на катоде флотиров родственных бактериям, способным к гетеротрофной фиксации  $\text{CO}_2$  (рис. 5в). В природных экосистемах этот процесс является малоинтенсивным (Braun et al., 2021), но за счет того, что доля способных осуществлять его микроорганизмов в МТЭ оказалось большой, а скорость поступления  $\text{CO}_2$  в верхнюю катодную часть устройства была ограничена диффузией через толстый слой хемоклина, можно предположить эффективное потребление углекислого газа микробной популяцией катода.

Таким образом, катодная популяция нашего МТЭ могла выступать в качестве активного газового биофильтра. С учетом того, что углекислый газ является парниковым газом, полученный результат можно считать важным с точки зрения разработки технологий биоремедиации с применением микробных топливных элементов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность коллективу ООО «ЛМТ» за отбор и предоставление почвенных проб и старшим научным сотрудникам Лаборатории геохимии горючих ископаемых Геологического факультета МГУ Калмыкову Антону Георгиевичу и Видищевой Олесе Николаевне за проведение аналитических исследований углеводов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 24-64-00023 (основная часть работ), Министерства науки и образования РФ.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атлас почв Российской Федерации. <https://soil-db.ru/soilatlas/razdel-3-pochvy-rossiyskoy-federacii/chernozemy-vyshchelochennye-i-opodzolennye?ysclid=m2ask93lwv52646867>. Accessed November 8, 2024.
- Губернский Ю.Д., Калинина Н.В., Гапонова Е.Б., Банин И.М. Обоснование допустимого уровня содержания диоксида углерода в воздухе помещений жилых и общественных зданий // Гигиена и санитария. 2014. Т. 6. С. 37–41.
- Кулагина Г.М., Кулагин С.С., Ключникова М.Ю. Мониторинг нефтяного загрязнения Винновской роши // Успехи современного естествознания. 2012. № 10. С. 90.
- Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тошчаков С.В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 671–680. <https://doi.org/10.1134/S0026365619060119>
- Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680. <https://doi.org/10.1134/S0026261719060110>
- Соколова Т.А., Толпешта И.И., Трофимов С.Я. Почвенная кислотность. Кислотно-основная буферность почв. Соединения алюминия в твердой фазе почвы и в почвенном растворе. Тула: Гриф и К, 2012. 124 с.
- Фёдорова Ю.А., Ахметова Г.И., Коржова Л.Ф., Ягафарова Г.Г. Изучение биодеструкции органических поллютантов ароматического ряда // Вестн. технологического университета. 2017. Т. 20. С. 143–146.
- Ambaye T.G., Vaccari M., Franzetti A., Prasad S., Formicola F., Rosatelli A., Hassani A., Aminabhavi T.M., Rtimi S. Microbial electrochemical bioremediation of petroleum hydrocarbons (PHCs) pollution: Recent advances and outlook // Chem. Engin. J. 2023. V. 452. Art. 139372. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139372>
- Anaerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology / Ed. Boll M. Springer, Cham. 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50391-2>.
- Braun A., Spona-Friedl M., Avramov M., Elsner M., Baltar F., Reinthaler T., Herndl G.J., Griebler C. Reviews and syntheses: heterotrophic fixation of inorganic carbon – significant but invisible flux in environmental carbon cycling // Biogeosci. 2021. V. 18. P. 3689–3700. <https://doi.org/10.5194/bg-18-3689-2021>
- Carlson H.K., Iavarone A.T., Gorur A., Yeo B.S., Tran R., Melnyk R.A., Mathies R.A., Auer M., Coates J.D. Surface multiheme c-type cytochromes from *Thermincola potens* and implications for respiratory metal reduction by Gram-positive bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 1702–1707. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112905109>
- Chen H., Simoska O., Lim K., Grattieri M., Yuan M., Dong F., Lee Y.S., Beaver K., Weliwatte S., Gaffney E.M., Minteer S.D. Fundamentals, applications, and future directions of bioelectrocatalysis // Chem. Rev. 2020. V. 120. P. 12903–12993. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00472>
- Douglas G.M., Maffei V.J., Zaneveld J.R., Yurgel S.N., Brown J.R., Taylor C.M., Huttenhower C., Langille M.G.I. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions // Nat. Biotechnol. 2020. V. 38. P. 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Erable B., Etcheverry L., Bergel A. From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater // Biofouling. 2011. V. 27. P. 319–326. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>
- Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // Protoc. Exch. 2016. <https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
- Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5116–5123. <https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14>
- Karstens L., Asquith M., Davin S., Fair D., Gregory W.T., Wolfe A.J., Braun J., McWeeney S. Controlling for contaminants in low-biomass 16S rRNA gene sequencing experiments // mSystems. 2019. V. 4. Art. e00290-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00290-19>
- Lahti L., Shetty S. Microbiome R package. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/microbiome.html>. Accessed August, 2024.
- Logan B.E., Rossi R., Ragab A., Saikaly P.E. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>

- Lovley D.R., Holmes D.E. Electromicrobiology: the ecophysiology of phylogenetically diverse electroactive microorganisms // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. V. 20. P. 5–19. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00597-6>
- Lovley D.R., Holmes D.E., Nevin K.P. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction // *Adv. Microb. Physiol.* 2004. V. 49. P. 219–286. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49005-5)
- Lusk B.G. Thermophiles; or, the modern Prometheus: the importance of extreme microorganisms for understanding and applying extracellular electron transfer // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 818. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00818>
- Marshall C.W., May H.D. Electrochemical evidence of direct electrode reduction by a thermophilic Gram-positive bacterium, *Thermicola ferriacetica* // *Energy Environ. Sci.* 2009. V. 2. P. 699–705. <https://doi.org/10.1039/b823237g>
- Matturro B., Viggi C.C., Aulenta F., Rossetti S. Cable bacteria and the bioelectrochemical snorkel: the natural and engineered facets playing a role in hydrocarbons degradation in marine sediments // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 952. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00952>
- Ntarlagiannis D., Atekwana E.A., Hill E.A., Gorby Y. Microbial nanowires: is the subsurface “hardwired”? // *Geophys. Res. Lett.* 2007. V. 34. Art. L17305. <https://doi.org/10.1029/2007GL030426>
- Oksanen J. Vegan: Community Ecology Package. R package. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan>. Accessed August 17, 2024.
- Package ‘ggvenn’. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggvenn/ggvenn.pdf>. Accessed August 17, 2024.
- Peters K.E., Moldowan J.M. The Biomarker Guide: Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediment. Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ. 1993. P. 40–45.
- Rogińska J., Perdicakis M., Midoux C., Bouchez T., Despas C., Liu L., Tian J.-H., Chaumont C., Jorand F.P.A., Tournebise J., Etienne M. Electrochemical analysis of a microbial electrochemical snorkel in laboratory and constructed wetlands // *Bioelectrochem.* 2021. V. 142. Art. 107895. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107895>
- Shi L., Dong H., Reguera G., Beyenal H., Lu A., Liu J., Yu H.Q., Fredrickson J.K. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. V. 14. P. 651–662. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.93>
- Wang L.Y., Nevin K.P., Woodard T.L., Mu B.Z., Lovley D.R. Expanding the diet for DIET: electron donors supporting direct interspecies electron transfer (DIET) in defined co-cultures // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 236. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00236>
- Yamamoto M., Takaki Y., Kashima H., Tsuda M., Tanizaki A., Nakamura R., Takai K. In situ electrosynthetic bacterial growth using electricity generated by a deep-sea hydrothermal vent // *ISME J.* 2023. V. 17. P. 12–20. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01316-6>

## Low CO<sub>2</sub> Footprint Remediation of Oil-Contaminated Soil in a Sediment Microbial Fuel Cell

G. S. Klyushin<sup>1</sup>, A. S. Gogov<sup>1, 2</sup>, A. E. Kolonsky<sup>1, 3</sup>, A. R. Stroeve<sup>4</sup>,  
I. M. Elizarov<sup>1</sup>, A. A. Klyukina<sup>1</sup>, S. N. Gavrilo<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>*S.N. Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences 119071, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*National Research Center “Kurchatov Institute” 123098, Moscow, Russia*

<sup>3</sup>*Center for Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology 121205, Moscow, Russia*

<sup>4</sup>*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University 119234, Moscow, Russia*

\*e-mail: [sngavrilo@gmail.com](mailto:sngavrilo@gmail.com)

**Abstract.** Active study of electrocatalytic properties of prokaryotes in the last 30 years has led to the creation of a new field of biotechnology – electricity generation in microbial fuel or electrolytic cells, where microbial cells act as biocatalysts of anodic or cathodic processes consuming organic matter or forming biomass and substances with added value during electrotrophic fixation of CO<sub>2</sub>. The most economically promising is the use of microbial fuel cells (MFC) for wastewater treatment and in bioremediation processes. Recently, the prospects for the introduction of MFC or stimulation of electroactive microbial communities for the purification of oil-contaminated anaerobic layers of soils and marine sediments have been considered. However, this version of the technology has a number of significant technical limitations. We describe a laboratory sedimentary MFC with a bioanode and biocathode inoculated with oil-contaminated soil, which for 210 days of continuous operation was the only source of power supply for an autonomous sensor for monitoring ambient air parameters. Electric current generation in the MFC was accompanied by the destruction of hydrocarbons in contaminated soil and the formation of various microbial populations in the anaerobic soil layer, at the anode and at the cathode, in which potential oil

destructors, electrogens and electrotrophs dominated, respectively. At the same time, the release of CO<sub>2</sub> against the background of ambient air was minimal, which indicates the formation of an effective gas filter in the MFC. Short-term incubation of the MFC in field conditions revealed a significant effect of temperature fluctuations on the physicochemical parameters of the device, its performance and the composition of the cathode microbial population. We consider in detail the changes in the phylogenetic and physiological diversity of microbial populations of different zones of the sedimentary MFC during its operation, and also outline the prospects and problems of the practical application of such systems for bioremediation of oil-contaminated soil.

**Keywords:** electroactive microorganisms, electrogens, electrotrophs, bioremediation of oil-contaminated soils, heterotrophic fixation of CO<sub>2</sub>, microbial fuel cell