

ПРОТАСОВА Елена Михайловна

**ВЛИЯНИЕ АКРИЛАМИДА НА АМИДАЗОСОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИИ РОДОВ
ALCALIGENES И *RHODOCOCCLUS* И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ БИОДЕТЕКЦИИ
ЭТОГО ТОКСИКАНТА**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» («ИЭГМ УрО РАН») – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), г. Пермь

Научный руководитель:

Максимова Юлия Геннадьевна, доктор биологических наук, доцент, зав. лабораторией молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН» – филиала ПФИЦ УрО РАН.

Официальные оппоненты:

Холявка Марина Геннадьевна – доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биофизики и биотехнологии, старший научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»;

Литти Юрий Владимирович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии антропогенных мест обитания Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Институт фармации, химии и биологии (308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85).

Защита состоится «___» ноября 2025 г. в ____.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.201.03 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ПФИЦ УрО РАН (г. Пермь, ул. Академика Королева, д. 3) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и состояние вопроса. Загрязнение окружающей среды становится глобальной проблемой современного мира. Контроль содержания поллютантов в воде, почве, атмосфере или продуктах питания входит в программу мониторинга за состоянием окружающей среды. Такие соединения обладают канцерогенными, мутагенными, токсическими или иными неблагоприятными свойствами для природных экосистем и здоровья человека (Michelini, Roda, 2012; Radwan *et al.*, 2019). Акриламид – высокотоксичное вещество, широко используемое в промышленности. Обладает высокой нейротоксичностью, генотоксичностью и классифицируется Всемирной организацией здравоохранения как канцероген группы 2А (потенциальный канцероген) (Wampler, Ensign, 2005; Тере, Себи, 2019). Акриламид находит промышленное применение как мономер для производства акриловых полимеров и пластмасс, используемых в качестве пластификаторов цементных растворов, флокулянтов для очистки сточных вод, загустителей, влагоудерживающих средств в составах агрохимических препаратов, для предотвращения эрозии почвы, в переработке руды, нефтегазовой промышленности, производстве бумаги, декоративной косметики, продуктов по уходу за кожей и волосами, строительных материалов, лаков, красок и др. (Дебабов, Яненко, 2011; Arvanitoyannis, Dionisopoulou, 2014; Eş, Vieira, Amaral, 2015). Агентство по охране окружающей среды США («US Environmental Protection Agency») установило ограничение уровня содержания этого мономера в природной среде – 0,05%. Основным источником загрязнения вод акриламидом – производства акриламида, синтеза полиакриламидов (ПАА) и других полимеров. В выбросах предприятий такого рода содержится до 1 г мономера акриламида на 1 л эффлюента. Кроме того, акриламид может попадать в воду в процессе водоподготовки, при герметизации канализации и в процессе переработки макулатуры (Maksimova *et al.*, 2020). Содержание акриламида в воде нормируется, и оно не должно превышать 0,35 мг/л для водных объектов рыбохозяйственного значения и 0,0001 мг/л для питьевой воды (Лопушанская, Максакова, Крылов, 2017).

Акриловые полимеры активно используются в качестве флокулянтов, способствуют эффективному разделению твердой и жидкой фаз в воде, содержащей взвешенные частицы (Wei *et al.*, 2018). Обычно они нетоксичны для растений и животных, однако присутствие мономеров в составе ПАА или их высвобождение при деградации полимера может являться причиной загрязнения окружающей среды (Jangkorn, Charoenpanich, Sriwiriyarat, 2018).

Одним из путей образования акриламида, известным как реакция Майяра, является высокотемпературная обработка богатой углеводами пищи, содержащей природную аминокислоту аспарагин и редуцирующие сахара (Нилова, Малютенкова, Вытовтов, 2017; Wampler, Ensign, 2005; Pan *et al.*, 2020).

На данный момент существует много работ, посвященных использованию ферментов или целых клеток амидазосодержащих бактерий в биокаталитических процессах (Полтавская и др., 2004; Дебабов, Яненко, 2011; Демаков и др., 2015; Максимова и др., 2015; Максимова, Якимова, Максимов, 2019; Sharma, Sharma, Bhalla, 2009; Kamal *et al.*, 2011). Известно, что микробная амидаза (КФ 3.5.1.4) может участвовать в деградации акриламида, и выделены бактерии, способные использовать акриламид как единственный источник углерода и энергии (Gafar,

Shukor, 2018). Среди бактерий, утилизирующих акриламид, изолированы представители родов *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Stenotrophomonas* и др. (Jebasingh *et al.*, 2013; Lakshmikandan *et al.*, 2014; Joshi, Abed, 2017; Jangkorn, Charoenpanich, Sriwiriyarat, 2018). Есть сведения о том, что клеточная стенка некоторых штаммов *Lactobacillus* может связывать акриламид, снижая тем самым его всасывание в пищеварительном тракте (Rivas-Jimenez *et al.*, 2016).

Микробному разложению полимеров акриламида посвящено незначительное количество работ. Из-за высокой молекулярной массы ПАА не могут проходить через биологические мембраны, а их биодegradация, по-видимому, инициируется внеклеточными ферментами (Caulfield *et al.*, 2003; Guezennec *et al.*, 2015; Gaytán, Burelo, Loza-Tavera, 2021). Однако только некоторые представители бактериальных родов *Enterobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Clostridium* способны использовать ПАА и его производные в качестве источника углерода и/или азота (Рогачева, Козулина, Кулакова, 2018; Joshi, Abed, 2017).

Существуют различные аналитические методы обнаружения и количественного определения акриламида в пищевых продуктах (Куликовский и др., 2019; Wenzl, De La Calle, Anklam, 2003; Тере, 2015) и водных образцах (Россинская и др., 2008; Кремко, Саракач, Докутович, 2012). Традиционными методами являются хроматографические (ВЭЖХ, ГХ и ЖХ) с их модификациями (Rosén, Hellenäs, 2002; Кеpekci Tekkeli, Önal С., Önal А., 2012; Lobsiger, Stark, 2019; Тере, Çebi, 2019; Pundir, Yadav, Chhillar, 2019; Pan *et al.*, 2020). Альтернативой хроматографическим методам может быть разработка биосенсоров на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов (Биосенсоры: основы и приложения ..., 1992; Варфоломеев, 1997; Понаморева и др., 2011; Решетилов, 2015; Плотникова, Шумкова, Шумков, 2016; Плеханова, Решетилов, 2019). Для определения акриламида были предложены биосенсоры, основанные на определении респираторной активности клеток *Brevibacterium* sp. (Ignatov *et al.*, 1997), на снижении генерации тока при обратимой конверсии Fe(II)/Fe(III) иммобилизованным гемоглобином при образовании аддуктов этого белка с акриламидом (Stobiecka, Radecka, Radecki, 2007; Krajewska, Radecki, Radecka, 2008; Batra, Lata, Pundir, 2013; Batra *et al.*, 2013; Yadav, Chhillar, Pundir, 2018), на взаимодействии с ДНК (Li *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016), на конверсии акриламида в акриловую кислоту амидазой клеток *P. aeruginosa* (Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). Однако предложенные биосенсоры обладают рядом недостатков, а именно дороговизной, сложностью технического исполнения, недолговечностью или использованием непростого в получении и эксплуатации биологического агента.

Токсичность акриламида в отношении высших организмов широко известна. Тем не менее, в литературе содержится мало сведений о влиянии акриламида на физиологическое состояние клеток бактерий и о токсичности этого вещества по отношению к прокариотам, недостаточно работ, посвященных возможности биоразложения ПАА и использования бактериями линейных полимеров акриламида в качестве субстрата для роста. Отсутствуют разработки простых и дешевых портативных анализаторов акриламида, основанных на использовании непатогенных бактерий, способных трансформировать это вещество. Для такого способа определения необходим выбор способа иммобилизации бактерий, который позволит долговременно и многократно проводить измерения, а также обеспечит сохранение активности при различных способах хранения биоселектирующего агента. В связи с этим представляется

актуальным изучение физиологических и биохимических особенностей амидазосодержащих бактерий для их применения в процессах биодетекции акриламида и биодеградации полимеров этого вещества.

Цель настоящей работы – исследовать физиологический ответ клеток бактерий родов *Alcaligenes* и *Rhodococcus* на присутствие акриламида в среде и разработать устойчивый биокатализатор на основе иммобилизованных бактерий для биодетекции данного токсиканта.

Основные задачи исследования:

1. Изучить влияние акриламида на физиологические показатели амидазосодержащих бактерий родов *Alcaligenes* и *Rhodococcus* (энергетический статус клеток, дыхательную активность, выживаемость) и оценить мутагенную активность этого соединения по отношению к бактериям;

2. Исследовать амидазную активность бактерий родов *Alcaligenes* и *Rhodococcus* при воздействии различных концентраций акриламида, способность роста с полиакриламидами, а также определить наиболее перспективные штаммы для практического применения;

3. Осуществить иммобилизацию клеток бактерий родов *Alcaligenes* и *Rhodococcus* различными способами, определить операционную стабильность и возможность долговременного хранения иммобилизованного биокатализатора в различных условиях;

4. Разработать способ биодетекции акриламида при участии иммобилизованных клеток бактерий родов *Alcaligenes* и *Rhodococcus* с выраженной амидазной активностью.

Научная новизна. Впервые всесторонне охарактеризованы физиологические и ростовые параметры клеток бактерий родов *Alcaligenes*, *Rhodococcus* и *Escherichia* при воздействии акриламида: дыхательная активность, жизнеспособность, энергетический статус клеток, люминесценция генно-инженерного штамма *E. coli* K12 TG1 (pXen7). Показано, что влияние акриламида только в высоких концентрациях вызывает снижение жизнеспособности и метаболической активности у большинства штаммов. Выявлена нецелесообразность использования генно-модифицированного штамма *E. coli* K12 TG1 (pXen7) в качестве тест-системы для мониторинга акриламида из-за отсутствия специфичности к этому соединению. Показано, что акриламид не обладает мутагенным действием в отношении прокариотов. Выявлено, что иммобилизация бактериальных клеток в структуру гелей альгината бария и агарозы либо самоиммобилизация в виде биопленок при росте на терморасширенном графите позволяет получить стабильные и механически прочные биокатализаторы. Показано, что оптимальным способом хранения иммобилизованных биокатализаторов на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру геля агарозы и альгината бария, является их замораживание при -20 и при -80°C . Показана перспективность использования клеток амидазосодержащего штамма *A. faecalis* 2, иммобилизованных в структуре геля агарозы, в качестве биоселектирующего элемента кондуктометрического биосенсора на акриламид. Показана способность *A. faecalis* 2 и *R. erythropolis* ИЛ БИО использовать анионные, катионные и неионогенные ПАА в качестве источника углеродного, азотного питания или единственного ростового субстрата.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационной работы расширяют представление о влиянии акриламида на физиологические особенности клеток бактерий родов *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Escherichia* и *Salmonella*. Показана устойчивость

большинства штаммов при воздействии возрастающих концентраций акриламида. Выявлено, что акриламид не обладает выраженным бактерицидным действием и генотоксичностью по отношению к индикаторным штаммам в стандартном тесте Эймса. Полученные результаты дополняют сведения, известные из научной литературы, посвященной изучению мутагенного эффекта данного токсиканта. Полученные данные могут служить теоретической основой для разработки микробного биосенсора на акриламид. Разработан прототип кондуктометрического микробного биосенсора на акриламид для биодетекции этого токсиканта в воде и водной вытяжке из пищевых продуктов, основанный на измерении электропроводности раствора с помощью кондуктометрического датчика при трансформации акриламида в акриловую кислоту, которая осуществляется внутриклеточной бактериальной амидазой живых бактериальных клеток, иммобилизованных включением в гель альгината бария или агарозы, а также самоиммобилизованных при выращивании биопленки на терморасширенном графите. Показан оптимальный способ длительного хранения иммобилизованных биокатализаторов, основанный на их замораживании. Получен патент на изобретение РФ (RU 2830305) «Способ биодетекции акриламида иммобилизованными клетками амидазосодержащих бактерий». Показано, что амидазосодержащие штаммы *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 могут деградировать катионные, анионные и неионогенный ПАА, используя их в качестве субстрата для роста. Более эффективная деградация полимера отмечена при его использовании бактериями в качестве источника азота с дополнительным источником углерода. Отмечено, что эффективность микробной деградации ПАА зависит от заряда полимера. В перспективе данные штаммы могут быть применены для утилизации избытков отработанного полимера. Результаты исследования используются в лекционных курсах для студентов бакалавриата и магистратуры биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Бактерии родов *Rhodococcus* и *Alcaligenes* обладают значительной устойчивостью к акриlamиду, причем *R. ruber* gt 1 с высокой активностью нитрилгидратазы наиболее устойчив к воздействию токсиканта. Акриламид не является мутагеном для прокариотов и только в концентрациях выше 500 мМ способен вызвать снижение жизнеспособности и метаболической активности у большинства штаммов;

2. Возрастание концентрации акриламида до 500 мМ не вызывает ингибирование амидазной активности бактерий родов *Rhodococcus* и *Alcaligenes*. Они могут использовать линейные катионные, анионные и неионогенные полиакриламиды в качестве субстрата роста, причем катионные и неионогенный полиакриламиды подвержены более эффективной микробной деградации, чем анионные;

3. Клетки *A. faecalis* 2, включенные в структуру гелей агарозы и альгината бария, а также биопленки бактерий родов *Rhodococcus* и *Alcaligenes*, выращенные на терморасширенном графите, наиболее эффективно и с наименьшей потерей ферментативной активности трансформируют акриламид в акриловую кислоту в процессе многократных реакций, по сравнению с иммобилизованными на других носителях;

4. Иммобилизованные клетки *A. faecalis* 2 сохраняют амидазную активность при длительном хранении и являются стабильным биоселектирующим агентом для

кондуктометрического определения акриламида в среде с пределом 10^{-3} М и временем полужизни не менее 500 ч.

Публикации и апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования» (Пермь, 2021); IX-ой Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2021); Международной конференции ученых-биологов «Фундаментальные и прикладные аспекты биологии» (Пермь, 2023); I-ой Международной научно-практической конференции «Инновационные биотехнологии для охраны окружающей среды: от теории к практике» (Минск, 2024); XX-ой Всероссийской научной конференции молодых ученых с международным участием «Экологическая безопасность в условиях антропогенной трансформации природной среды», посвященной памяти Г.А. Воронова, Н.Ф. Реймерса и Ф.Р. Штильмарка (Пермь, 2025).

Результаты проведенных исследований опубликованы в 15 научных работах: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 2 публикации в журналах, входящих в базу Scopus и Web of Science, а также тезисы 11 докладов и 1 патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 7 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, 1 главы результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Список литературы включает 136 источников, из них 43 отечественных и 93 зарубежных авторов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Исследования выполнены при финансовой поддержке Государственного задания на тему «Биоразнообразие микроорганизмов в антропогенно-загрязненных экосистемах и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям внешней среды», регистрационный номер НИОКТР 124020500028-4.

Автором самостоятельно выполнена основная часть экспериментов, проведена их математическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов. Подготовка к печати научных работ, отражающих результаты диссертационного исследования, осуществлена автором самостоятельно или при участии соавторов. Метод ВЭЖХ выполнен в лаборатории молекулярной биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиала ПФИЦ УрО РАН.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объекты исследования. В работе использовали амидазосодержащие штаммы *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. erythropolis* 6-21, *R. ruber* gt 1, *R. erythropolis* ИЛ БИО, *Alcaligenes faecalis* 2, селекционированные в лаборатории молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН» – филиала ПФИЦ УрО РАН. Также в работе были использованы штаммы *E. coli* K12, *E. coli* K12 TG1 (pXen7), содержащий полный lux-оперон *Photobacterium luminescens* размером 7 тыс. п.н., любезно предоставленный к.б.н. И.Л.

Масленниковой (ПФИЦ УрО РАН, Россия), *Salmonella typhimurium* TA1538 и *S. typhimurium* TA1535, гистидинзависимые ауксотрофы, сконструированные в лаборатории Эймса (Университет Калифорнии, Беркли, США) из исходного штамма *S. typhimurium* LT-2 дикого типа.

Амидазная активность *R. erythropolis* 11-2 была изучена ранее (Максимова и др., 2015), а *R. ruber* gt 1 селекционирован в направлении увеличения нитрилгидратазной активности и подавления амидазной активности с целью использования этого штамма в процессе получения акриламида (АА) из акрилонитрила (Maksimov *et al.*, 2003).

Определение амидазной активности бактериальных штаммов. Определение амидазной активности основано на реакции трансформации 100 мМ раствора АА в акриловую кислоту (АК). Концентрацию АК определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Infinity II JC 1260 («Agilent», Германия) с колонкой Synergi 4u Hydro–RP 80A (250 × 4,6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 25 мМ NaH₂PO₄ и 5% ацетонитрил, скорость потока составляла 0,500 мл/мин при температуре 25°C, детекцию проводили при $\lambda = 210$ нм.

Определение концентрации АТФ биолюминесцентным методом при воздействии акриламида. Для оценки влияния 20–1000 мМ растворов АА на содержание внутриклеточного АТФ в клетках бактериальных штаммов использовали стандартный набор реактивов АТР Bioluminescent Assay Kit («Sigma», США), в состав которого входит люцифераза светляков и люциферин (субстрат для фермента). Люминесценцию регистрировали на универсальном микропланшетном ридере Infinite M1000pro («Tecan», Швейцария).

Определение биолюминесценции *E. coli* K12 TG1 (pXen7) при воздействии акриламида. Влияние 10–1500 мМ растворов АА на клетки генно-модифицированного штамма *E. coli* K12 TG1 (pXen7) оценивали по гашению люминесценции. Определение проводили в 96-луночном белом непрозрачном планшете. Люминесценцию регистрировали на универсальном микропланшетном ридере Infinite M1000pro («Tecan», Швейцария) после 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 120 мин экспозиции с АА.

Определение выживаемости бактерий в присутствии акриламида. Штаммы бактерий культивировали в среде LB, содержащей разные концентрации АА, на роторной качалке при постоянном перемешивании со скоростью 160 об./мин и температуре 25°C в течение 7 сут., после чего высевали на агаризованную питательную среду LB из 10-кратных разведений. Чашки Петри инкубировали в термостате при 30°C в течение 1–7 сут в зависимости от скорости роста культуры. Жизнеспособность бактериальных штаммов на среде, содержащей АА, оценивали подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ).

Определение дыхательной активности бактериальных клеток при воздействии акриламида. Для определения жизнеспособных клеток в присутствии АА использовали стандартный набор реактивов ХТТ Cell Proliferation Assay Kit («Roche», Германия), в состав которого входят реагент ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид) и реагент для активации (феназинметасульфат). ОП образовавшегося красителя (ярко-оранжевого формазана) в результате восстановления тетразолиевой соли в присутствии активно респираторных клеток измеряли на микропланшетном ридере Infinite M1000pro («Tecan», Швейцария) при 475 и 660 нм. Удельную абсорбцию высчитывали из разности средних значений ОП исследуемых длин волн.

Определение мутагенного действия акриламида на штаммы *Salmonella typhimurium*. Предварительно определяли минимальные подавляющие и бактерицидные концентрации АА для индикаторных штаммов. Жизнеспособность оценивали в результате высева на агаризованную среду ГРМ («ФБУН ГНЦ ПМБ», Россия) с АА из серийных разведений при подсчете КОЕ. Мутагенную активность АА исследовали полуколичественным методом стандартного теста Эймса с внесением исследуемых концентраций соединения в слой полужидкого агара (без метаболической активации). Наличие мутагенного эффекта регистрировали путем учета обратных мутаций у штаммов от ауксотрофности по гистидину к прототрофности (Ames, 1971; Ames, Lee, Durston, 1973; Ames, McCann, Yamasaki, 1975).

Определение роста бактерий на среде с линейными полиакриламидами. Способность бактерий использовать ПАА в качестве источника углеродного, азотного питания или единственного ростового субстрата изучали на жидкой безазотистой минеральной среде. В качестве субстратов роста использовали линейные ПАА в концентрации 0,1, 0,05 и 0,01%: Праестол 857 BS и Праестол 650 BC, обладающие катионной активностью; Праестол 2530 и Праестол 2540, обладающие анионной активностью; Праестол 2300 D, обладающий неионогенной активностью (Институт технической химии УрО РАН, Пермь). Рост бактерий оценивали по изменению ОП₅₄₀ клеточной суспензии, измеренной на фотоэлектроколориметре КФК-3 (АООТ «ЗОМЗ», Россия) в 0,5 см кюветах. Динамический коэффициент вязкости среды измеряли в течение 2 мин при 100 г/см на ротационном вискозиметре ROTAVISC lo-vi Complete («ИКА», Германия).

Иммобилизация бактериальных клеток. Иммобилизацию амидазосодержащих клеток бактерий осуществляли включением в структуру гелей немодифицированного или модифицированного углеродными нанотрубками альгината бария, агарозы и κ-каррагинана, на неактивированном и активированном хитозане, адгезией или выращиванием биопленок на терморасширенном графите.

Определение операционной стабильности иммобилизованного биокатализатора. Операционную стабильность биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток оценивали по количеству АК при последовательном проведении полной конверсии 100 мМ раствора АА, вносимого в каждом цикле в реакционную среду. Время полного цикла составляло 24 ч. Концентрацию АК определяли методом ВЭЖХ. После проведения реакционного цикла биокатализаторы отфильтровывали через фильтр обеззоленный «белая лента» или «красная лента» (ООО «Бавер», Россия), отмывали калий-фосфатным буфером (pH $7,2 \pm 0,2$) и использовали в следующем цикле.

Определение электропроводности раствора с иммобилизованными биокатализаторами. Электропроводность реакционной среды с биокатализаторами оценивали по изменению проводимости раствора в результате трансформации 100 мМ АА в АК в 20 мл дистиллированной воды при 25°C. Удельную электропроводность измеряли на мультимониторе TDS/EC/Sal/Res SanXin SX650 («SanXin Instrumentation», Китай) сразу после добавления субстрата и через 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин.

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета лицензионной программы MS Excel 2019. При статистической обработке определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение,

стандартную ошибку среднего. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние акриламида на энергетический статус клеток бактерий родов *Rhodococcus* и *Alcaligenes*. Добавление АА к суспензии *R. ruber* gt 1 не вызывало существенного изменения концентрации АТФ в его клетках по сравнению с контрольным вариантом. При воздействии разных концентраций АА на клетки *A. faecalis* 2 было выявлено достоверное снижение концентрации АТФ по сравнению с контролем. В клетках культур *R. erythropolis* 4-1 и 11-2 наблюдалось аналогичное снижение концентрации АТФ в ответ на воздействие разных концентраций АА по сравнению с контролем, но оно не являлось достоверным. В клетках *R. erythropolis* 6-21 выявлено достоверное снижение содержания внутриклеточного АТФ по сравнению с контролем при концентрации субстрата 20, 50 и 1000 мМ. При воздействии 100 мМ АА снижение является недостоверным (рис. 1).

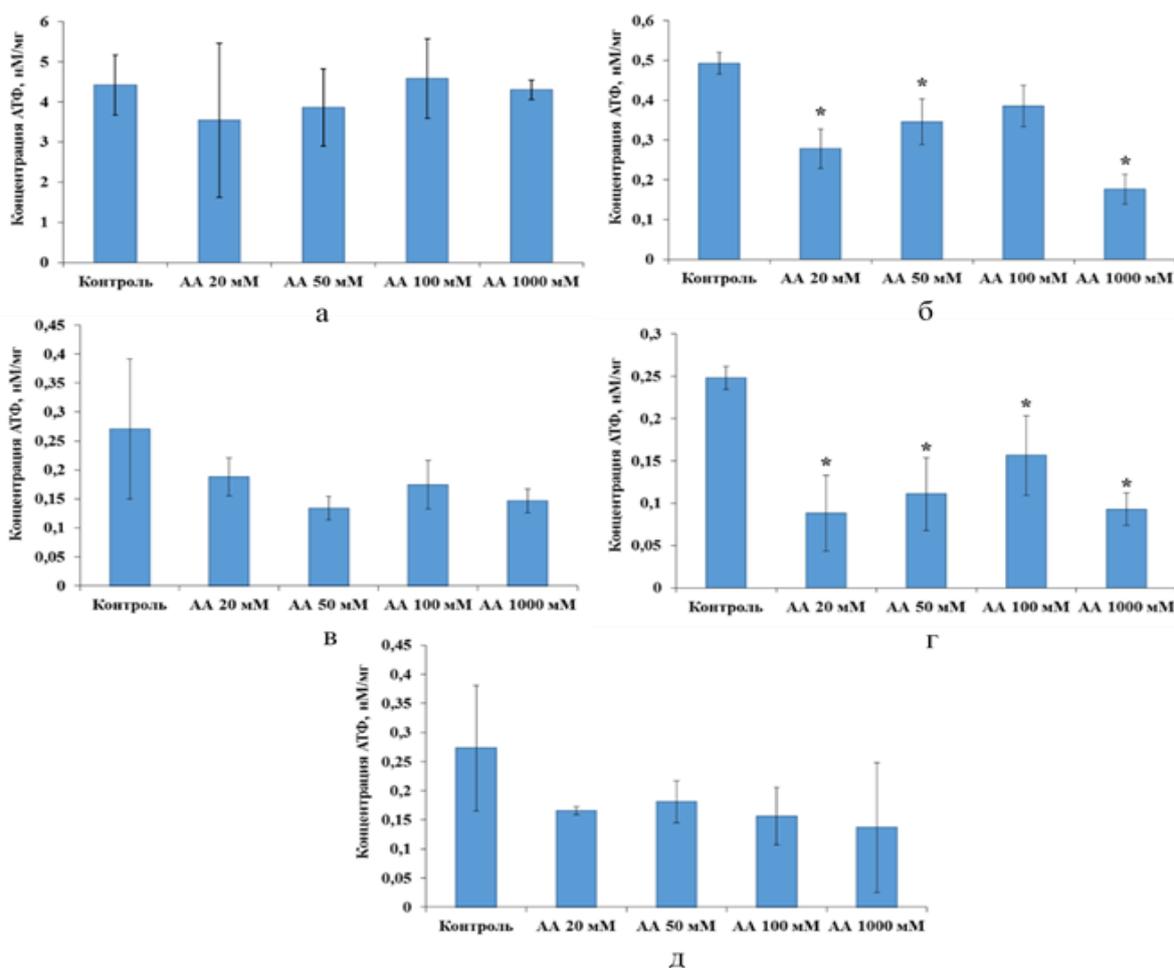


Рисунок 1. Зависимость содержания АТФ в клетках *R. ruber* gt 1 (а), *R. erythropolis* 6-21 (б), *R. erythropolis* 4-1 (в), *A. faecalis* 2 (г) и *R. erythropolis* 11-2 (д) от концентрации АА при 20-минутной экспозиции (* $p < 0,05$)

Полученные данные свидетельствуют о том, что 20-минутное воздействие даже 1 М раствора АА не приводит к полному ингибированию энергетического метаболизма. Отмечено, что самым устойчивым к токсическому действию АА среди изученных штаммов был *R. ruber*

gt 1. Снижение концентрации внутриклеточной АТФ в его клетках не наблюдалось при воздействии АА в концентрации до 1 М. Эффект может быть связан с тем, что данный штамм селекционирован в направлении повышения нитрилгидратазной активности, а при гидролизе высоких концентраций акрилонитрила клетки подвергаются действию продукта трансформации – АА.

Зависимость активности амидазы *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2 от концентрации акриламида. Выявлено, что при увеличении концентрации АА от 5 до 500 мМ наблюдается постепенное возрастание активности фермента штамма *R. erythropolis* 4-1. В этом диапазоне концентраций субстрата не происходило ингибирования ферментативной активности. В отличие от родококка, у *A. faecalis* 2 до концентрации АА 100 мМ активность возрастала практически линейно, после чего она постепенно снижалась, что может быть связано с насыщением активных центров фермента субстратом. Таким образом, высокие концентрации АА не приводят к ингибированию амидазной активности изученных бактерий.

Влияние акриламида на биолюминесценцию *E. coli* K12 TG1 (pXen7). Было исследовано влияние концентрации АА в диапазоне от 10 до 1500 мМ при разном времени воздействия на свечение генно-модифицированного штамма *E. coli*, используемого в качестве сенсора на токсичные вещества. Выявлено, что при возрастании концентраций АА происходит снижение люминесценции при 0-, 10-, 20-, 30-, 40-, 50- и 120-минутной экспозиции. Показано, что 50%-ное гашение люминесценции штамма с АА наблюдалось при концентрациях 500, 350, 250, 210, 190, 150 и 100 мМ АА при времени экспозиции 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 120 мин соответственно (рис. 2).

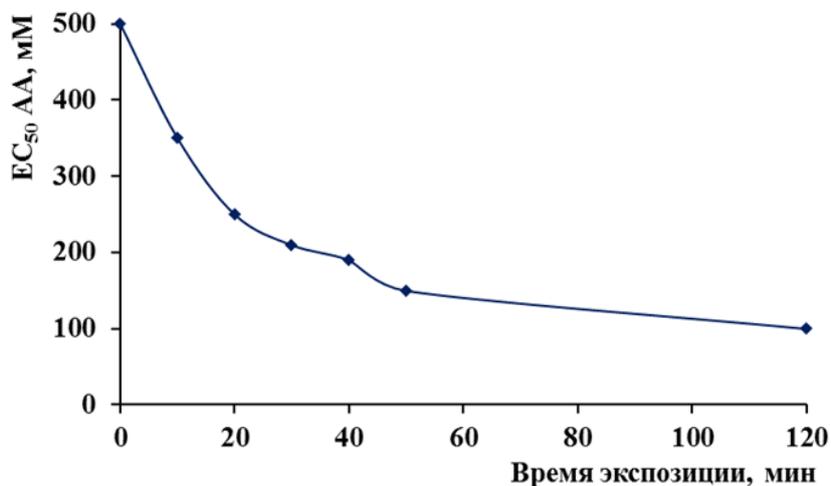


Рисунок 2. Гашение свечения *E. coli* K12 TG1 (pXen7) на 50% (EC₅₀) в зависимости от времени экспозиции с АА

Таким образом, гашение люминесценции на 50% имело прямую зависимость от времени воздействия и концентрации АА. Чем выше была концентрация АА, тем меньше времени экспозиции с этим токсикантом требовалось для 50%-ного гашения люминесценции. Показано, что EC₅₀ для АА при 120-минутном воздействии составляла 7108 мг/л, тогда как для водных беспозвоночных EC₅₀ АА составляет 98 мг/л при воздействии в течение 48 ч. Полученные результаты дают основание сделать вывод, что токсичность АА для бактериальных клеток невысока.

Рост бактерий разных систематических групп на среде, содержащей акриламид. У изученных штаммов, кроме *R. erythropolis* 11-2, было выявлено отсутствие роста на полноценной питательной среде в присутствии АА в концентрации от 500 мМ и выше. У родококков АА в концентрации 10–20 мМ вызывал снижение количества КОЕ менее, чем на порядок, по сравнению с контролем, а у *A. faecalis* 2 такое незначительное снижение отмечается при концентрации 10–50 мМ. Дальнейшее увеличение концентрации АА в среде приводило к снижению КОЕ на порядок и более. При содержании АА в среде, равном 250 ммоль/л, сохраняется от 0,016 до 0,116% жизнеспособных бактериальных клеток (Таблица 1 и 2).

Таблица 1

Рост штаммов *Rhodococcus* на среде, содержащей АА

Вариант опыта	<i>R. erythropolis</i> 6-21	<i>R. ruber</i> gt 1	<i>R. erythropolis</i> 11-2
	КОЕ / мл		
Контроль	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^8$	$(6,0 \pm 1,2) \times 10^7$	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^8$
АА, 10 мМ	$(1,05 \pm 0,30) \times 10^8$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^7$	$(2,0 \pm 0,4) \times 10^8$
АА, 20 мМ	$(1,75 \pm 0,13) \times 10^8$	$(0,9 \pm 0,1) \times 10^7$	$(1,75 \pm 0,40) \times 10^8$
АА, 50 мМ	$(3,0 \pm 0,6) \times 10^7$	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^7$	$(1,45 \pm 0,22) \times 10^7$
АА, 100 мМ	$(1,25 \pm 0,22) \times 10^6$	$(1,15 \pm 0,40) \times 10^6$	$(5,0 \pm 1,3) \times 10^5$
АА, 250 мМ	$(2,25 \pm 0,20) \times 10^4$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^5$
АА, 500 мМ	Нет роста	Нет роста	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^4$
АА, 1000 мМ	Нет роста	Нет роста	Нет роста

Таблица 2

Рост штаммов *Escherichia* и *Alcaligenes* на среде, содержащей АА

Вариант опыта	<i>E. coli</i> K12	<i>A. faecalis</i> 2	<i>E. coli</i> K12 TG1 (pXen7)
	КОЕ / мл		
Контроль	$(6,0 \pm 0,4) \times 10^8$	$(1,40 \pm 0,25) \times 10^9$	$(7,0 \pm 0,6) \times 10^8$
АА, 10 мМ	$(5,0 \pm 0,2) \times 10^8$	$(0,8 \pm 0,1) \times 10^9$	$(4,45 \pm 0,20) \times 10^8$
АА, 20 мМ	$(4,75 \pm 0,50) \times 10^8$	$(0,80 \pm 0,05) \times 10^9$	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^8$
АА, 50 мМ	$(7,0 \pm 1,0) \times 10^7$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^9$	$(1,8 \pm 0,3) \times 10^8$
АА, 100 мМ	$(3,2 \pm 0,4) \times 10^6$	$(0,5 \pm 0,2) \times 10^8$	$(3,85 \pm 0,15) \times 10^6$
АА, 250 мМ	Нет роста	$(0,40 \pm 0,03) \times 10^6$	$(8,1 \pm 0,1) \times 10^5$
АА, 500 мМ	Нет роста	Нет роста	Нет роста
АА, 1000 мМ	Нет роста	Нет роста	Нет роста

Воздействие акриламида на дыхательную активность штаммов *Rhodococcus* и *A. faecalis* 2. Показано, что при возрастании концентраций АА от 10 до 1000 мМ происходит снижение количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем у большинства штаммов (рис. 3). При этом *R. ruber* gt 1 проявил наибольшую устойчивость, тогда как *A. faecalis* 2 был более чувствителен к данному веществу по сравнению с родококками. К 4-му часу воздействия 1 М раствора АА у родококков сохранялось от 30,12 до 68,70% (у наиболее устойчивого *R. ruber* gt 1) дыхательной активности по сравнению с контролем. Наименее устойчивый штамм *A. faecalis* 2 сохранял к 6-му часу лишь 6,54% активности по сравнению с контролем. Таким образом, показано, что изученные бактериальные штаммы устойчивы к АА.

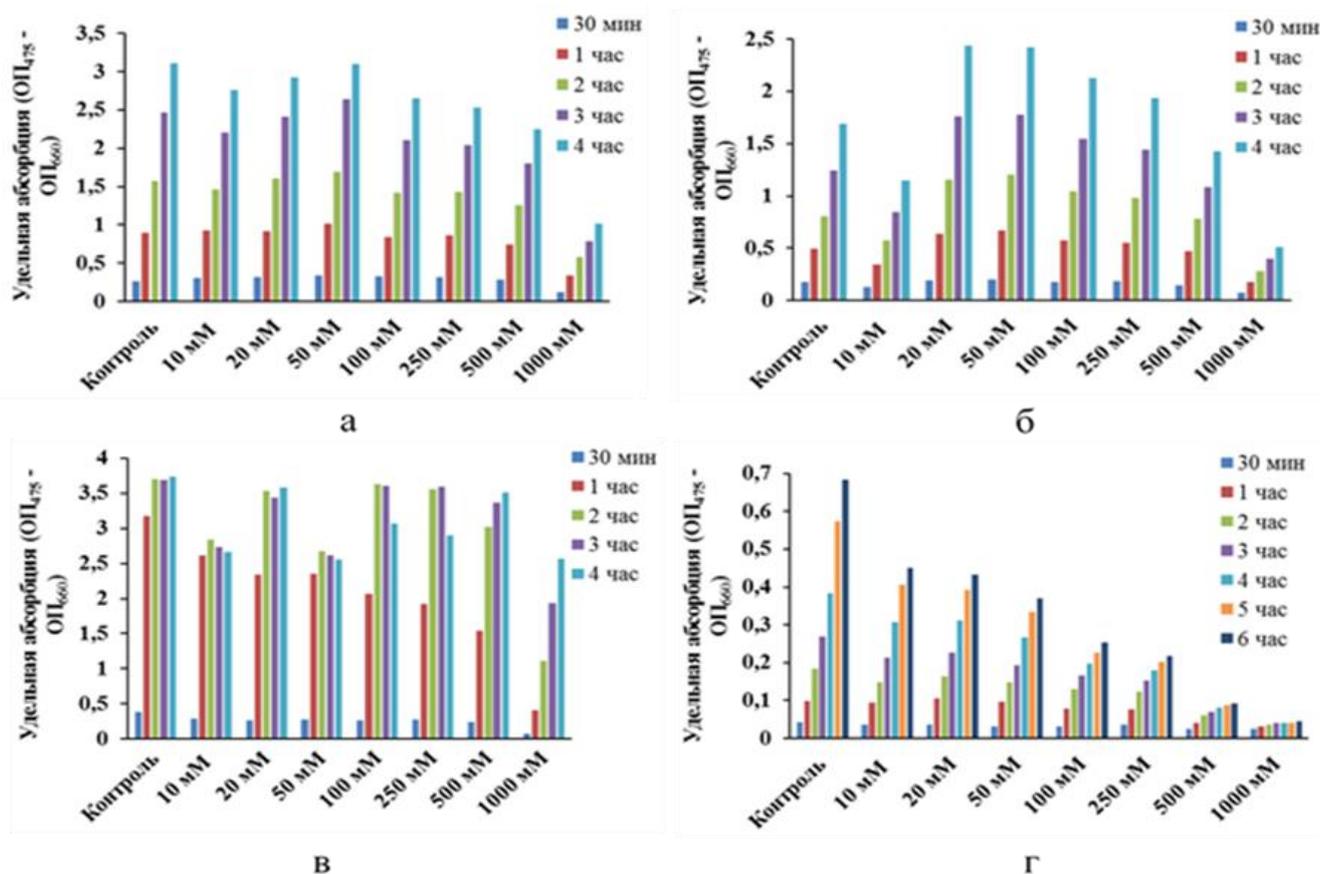


Рисунок 3. Зависимость удельной абсорбции (ОП₄₇₅ – ОП₆₀₀) суспензии *R. erythropolis* 4-1 (а), *R. erythropolis* 11-2 (б), *R. ruber* gt 1 (в), *A. faecalis* 2 (г) после окраски реактивом ХТТ от времени воздействия и концентрации АА, отражающая дыхательную активность клеток

Определение мутагенного действия акриламида на штаммы *Salmonella typhimurium*. Установлено, что АА не проявляет выраженного бактерицидного действия и по отношению к индикаторным штаммам *S. typhimurium*. Сравнение числа колоний ревертантов на опытных и контрольных чашках показало отсутствие прямой мутагенной активности АА (Таблица 3). Тестируемое вещество не индуцировало ни мутаций типа сдвига рамки считывания, выявляемых на штамме TA1538, ни замены пар оснований на штамме TA1535. Таким образом, АА не обладает генотоксичностью в бактериальной тест-системе без добавления микросомальной фракции.

Полученные данные дополняют ранее известные сведения, касающиеся воздействия АА, и в сопоставлении с данными научной литературы (Charoenpanich, 2013; Li *et al.*, 2014; Duda-Chodak *et al.*, 2016) позволяют заключить, что это соединение малотоксично для бактерий, а его токсические свойства проявляются, главным образом, по отношению к эукариотическим организмам.

Результаты опыта по оценке мутагенной активности АА методом его внесения в слой полужидкого агара (без метаболической активации)

Вариант опыта	Среднее число колоний на чашках при использовании тест-штаммов		Результаты оценки мутагенной активности (индексы) на штаммах	
	<i>S. typhimurium</i> TA1538	<i>S. typhimurium</i> TA1535	<i>S. typhimurium</i> TA1538	<i>S. typhimurium</i> TA1535
Контроль чистый (культура + вода)	30	18		
Позитивный контроль (мутаген)	1741	1739	«++»	«++»
АА, 0,25 мМ	24	20	«-»	«-»
АА, 2,5 мМ	30	18	«-»	«-»
АА, 25 мМ	26	16	«-»	«-»
АА, 250 мМ	17	20	«-»	«-»
АА, 2500 мМ	10	7	«-»	«-»

Примечание: «-» – не выявлена мутагенная активность, «++» – выявлена средняя мутагенная активность

Культивирование бактерий *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 на среде с линейными полиакриламидами. Установлено, что клетки *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 могут использовать катионный ПАА 857 BS в концентрации 0,05% как в качестве источника азота или углерода, так и единственного субстрата для роста биомассы. Наибольший рост этих бактерий наблюдали в среде с данным полимером в качестве источника углерода при добавлении дополнительного источника азота, а также как единственного источника углерода и азота. Амидазосодержащие штаммы бактерий эффективнее использовали анионный ПАА 2530 в концентрации 0,05% и 0,01% в качестве источника азота с внесением дополнительного источника углерода – глюкозы или ацетата натрия. Выявлено, что *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 могут использовать для роста ПАА катионный 650 BS, анионный 2540 и неионогенный 2300 D в концентрации 0,1, 0,05 и 0,01% в качестве источника азота. При этом наибольший рост бактерий наблюдали в среде с неионогенным полимером в концентрации 0,1%. Выявлено снижение динамического коэффициента вязкости среды при росте *R. erythropolis* ИЛ БИО с катионным и неионогенным ПАА в концентрации 0,05 и 0,01%, а также анионным ПАА в концентрации 0,1, 0,05 и 0,01% в качестве источника азота с дополнительным источником углерода – глюкозой. Показано снижение динамического коэффициента вязкости среды при росте *A. faecalis* 2 с ПАА 650 BS и 2300 D в концентрации 0,1 и 0,05%, а также 2540 в концентрации 0,1, 0,05 и 0,01% в качестве источника азота с дополнительным внесением ацетата натрия. Следует отметить, что не во всех случаях рост амидазосодержащих бактерий коррелировал со снижением вязкости полимера. Возможно, это связано с отщеплением аминокрупп, не затрагивающим углеродный остов молекулы. Однако в естественных условиях на полимер воздействует комплекс физико-химических факторов (ультрафиолетовое

излучение, изменения pH среды и сезонные колебания температур), что вместе с биохимической деятельностью микроорганизмов может привести к деструкции полимера.

Операционная стабильность иммобилизованных биокатализаторов *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2. Биокатализаторы, приготовленные на основе клеток *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2, включенных в структуру к-каррагинана, оказались наименее стабильными по сравнению с другими типами матриц. После проведения 1–3 циклов трансформации субстрата гранулы подверглись растворению в реакционной среде. Установлено, что количество АК при трансформации АА биокатализаторами на основе иммобилизованных клеток *R. erythropolis* 4-1 после 1 цикла снижается и остается примерно на одном уровне на протяжении всех циклов. Количество АК, образующейся в каждом цикле, для биокатализаторов, иммобилизованных включением в структуру геля альгината бария и агарозы, составляло 1–2 мг на протяжении 18 циклов, а при использовании хитозана – 0,25–1 мг на протяжении 7 циклов. Для штамма *R. erythropolis* 4-1 было показано, что использование агарозы в качестве носителя дает наилучшие результаты по сравнению с другими типами матриц, так как не наблюдается потеря клеток в реакционной среде при повторном использовании биокатализатора. Биокатализаторы на основе клеток *A. faecalis* 2, иммобилизованных в структуру геля альгината бария и агарозы, оказались наиболее стабильными по сравнению с клетками, иммобилизованными на активированном и неактивированном хитозане, а также включенными в структуру к-каррагинана. Выявлено, что наибольшее количество АК за цикл образовывалось при трансформации АА биокатализатором на основе альгината бария – 70–100 мг в отличие от биокатализатора, иммобилизованного в структуре агарозного геля (55–75 мг). Несмотря на наибольшее количество АК, синтезированное биокатализатором на основе альгината бария, использование этого геля не является предпочтительным. Гранулы геля со временем теряли механическую прочность и разрушались при проведении последовательных циклов трансформации АА, чего не наблюдалось при использовании агарозы.

Для повышения механической прочности альгинатных гранул использовали многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ). При использовании модифицированного таким способом носителя после 20 циклов сохранялось 64% активности биокатализатора *A. faecalis* 2 от проявляемой в первых циклах. Выявлено, что наибольшее количество АК (35–40 мг) за цикл образуется при трансформации АА биокатализатором, содержащим 0,9 мг клеток. Показано, что при длительной эксплуатации за счёт увеличения механической прочности модифицированного носителя у такого биокатализатора появлялись преимущества перед бактериальными клетками, иммобилизованными в структуре немодифицированного альгината бария.

Операционная стабильность биокатализаторов на основе клеток *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2, иммобилизованных на терморасширенном графите. Биокатализаторы, приготовленные на основе адгезированных клеток *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 оказались менее стабильными по сравнению с биопленками на ТРГ. Адгезированные клетки родококков в каждом цикле синтезировали 4–7 мг АК на 0,5 г биокатализатора, а *A. faecalis* 2 – 1–2 мг. После проведения 7 циклов трансформации субстрата количество АК значительно снизилось, что может быть связано с десорбцией клеток и их вымыванием с носителя в результате многократного использования. Амидазная активность

биофленок *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ сохранялась на протяжении 30 проведенных циклов, а *R. erythropolis* 4-1 – 5 циклов. Выявлено, что наибольшее количество АК образовывалось при трансформации АА биокатализатором на основе биофленок *R. erythropolis* 11-2 на ТРГ (0,5 г) – 100–120 мг, биокатализатором на основе *A. faecalis* 2 – 80–100 мг. Наименьшее количество кислоты (1–3 мг) продуцировали биофленки *R. erythropolis* 4-1.

Операционная стабильность иммобилизованного амидазосодержащего биокатализатора после длительного хранения в различных условиях. Определена операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру гелей агарозы и альгината бария, после 7 мес. хранения в следующих условиях: при 22–25°C после высушивания при 37°C; при 22–25°C в буферном растворе; при 4–6°C в буферном растворе; при –20°C; при –80°C. После хранения определили амидазную активность биокатализатора и оценили возможность многократного использования (Таблица 4 и 5). Амидазная активность высушенных биокатализаторов после хранения при комнатной температуре была ингибирована после второго цикла реакции. Альгинатные гранулы после хранения при 22–25°C и 4–6°C со временем теряли механическую прочность и разрушались при проведении последовательных циклов реакции. Агарозные гранулы с иммобилизованными клетками в этих условиях не подвергались разрушению. Было показано, что оптимальным способом хранения биокатализаторов является их замораживание. При этом способе хранения исходная активность биокатализатора не снижалась на протяжении 7 циклов реакции. Установлено, что использование агарозы в качестве матрицы для иммобилизации биокатализаторов является предпочтительным по сравнению с альгинатом бария.

Таблица 4

Количество АК (мг/проба), образованной иммобилизованными клетками *A. faecalis* 2 в процессе последовательных реакций трансформации 100 мМ АА после 7 мес. хранения в различных условиях

Цикл	АК, мг/проба				
	22–25°C		4–6°C	–20°C	–80°C
	сухой	влажный			
Иммобилизованные клетки в структуре геля альгината бария					
1	0,32 ± 0,13	10,04 ± 1,38	12,55 ± 1,53	18,500 ± 0,001	18,23 ± 0,08
2	0,24 ± 0,07	8,63 ± 0,10	17,21 ± 0,28	19,80 ± 0,34	21,38 ± 0,91
3	0	8,76 ± 0,78	17,36 ± 0,013	18,0 ± 0,45	17,87 ± 0,34
4	0	6,91 ± 0,07	16,99 ± 1,76	14,96 ± 0,37	20,01 ± 0,40
5	0	5,43 ± 0,65	17,67 ± 0,78	16,42 ± 0,53	22,76 ± 1,00
6	0	5,64 ± 0,04	17,81 ± 1,31	16,40 ± 0,42	18,95 ± 0,87
7	0	6,88 ± 0,87	17,45 ± 0,35	13,99 ± 0,80	17,87 ± 0,15

Примечание: исходная амидазная активность неиммобилизованных клеток 0,6 мкмоль/мг/мин, амидазная активность сразу после иммобилизации в альгинате бария 0,59 мкмоль/мг/мин. В одной пробе содержалось 3 мг клеток, иммобилизованных в структуре альгината бария

Количество АК (мг/проба), образованной иммобилизованными клетками *A. faecalis* 2 в процессе последовательных реакций трансформации 100 мМ АА после 7 мес. хранения в различных условиях

Цикл	АК, мг/проба				
	22–25°C		4–6°C	–20°C	–80°C
	сухой	влажный			
Иммобилизованные клетки в структуре геля агарозы					
1	0	2,38 ± 0,37	7,66 ± 0,53	7,26 ± 0,11	11,20 ± 0,65
2	0,07 ± 0,01	2,14 ± 0,39	9,41 ± 0,86	7,41 ± 0,25	14,41 ± 1,39
3	0	1,93 ± 0,05	10,63 ± 0,77	10,14 ± 0,51	15,07 ± 1,73
4	0,070 ± 0,001	3,28 ± 0,04	8,65 ± 0,35	8,79 ± 0,30	10,91 ± 0,36
5	0	1,99 ± 0,12	6,88 ± 0,04	7,34 ± 0,48	10,13 ± 0,74
6	0,063 ± 0,003	1,94 ± 0,06	7,74 ± 0,45	7,93 ± 0,13	12,18 ± 1,16
7	0	2,27 ± 0,68	7,45 ± 0,30	6,12 ± 0,31	11,47 ± 0,84

Примечание: исходная амидазная активность неиммобилизованных клеток 0,6 мкмоль/мг/мин, амидазная активность сразу после иммобилизации в агарозе 0,14 мкмоль/мг/мин. В одной пробе содержалось 9 мг клеток, иммобилизованных в агарозе

Разработка прототипа кондуктометрического биосенсора на акриламид. В работе предложен принцип биодетекции АА, основанный на определении электропроводности раствора при трансформации АА в АК иммобилизованными бактериальными клетками с амидазной активностью. Образующаяся в процессе биохимической реакции АК за счет электролитической диссоциации увеличивала электропроводность раствора, тогда как АА не обладал таким свойством. Представлена зависимость электропроводности растворов от концентрации АК (рис. 4).

На основании калибровочного графика получено уравнение (1), позволяющее по электропроводности определить концентрацию АК в растворе:

$$x = (y - 0,2743) / 0,0068 \quad (1).$$

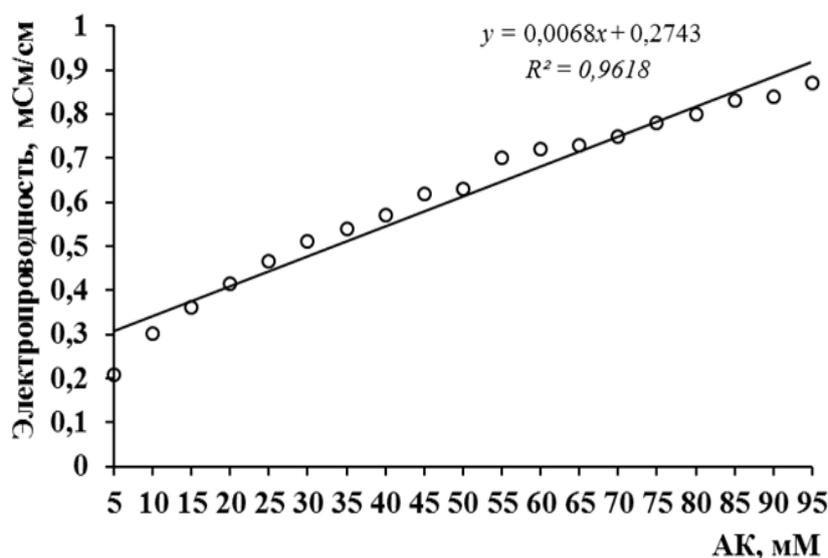


Рисунок 4. Электропроводность растворов АК

Определена удельная электропроводность водных растворов после трансформации АА в АК иммобилизованными клетками. Контролем являлись гранулы агарозы и альгината бария без бактериальных клеток с АА и иммобилизованные клетки без АА. Электропроводность раствора в последних двух вариантах не изменялась. В опытных вариантах наибольшее увеличение электропроводности раствора (470 мкСм/см за 1 ч) было получено при трансформации АА клетками *A. faecalis* 2, иммобилизованными в структуре геля агарозы (Таблица 6).

Таблица 6

**Удельная электропроводность (мкСм/см) водного раствора при трансформации АА
иммобилизованными биокатализаторами**

Время, мин	Удельная электропроводность, мкСм/см							
	<i>A. faecalis</i> 2, альгинат бария		<i>A. faecalis</i> 2, агароза		<i>R. erythropolis</i> 11- 2, альгинат бария		<i>R. erythropolis</i> 4-1, альгинат бария	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0	29	55	150	60	17	60	15	32
10	30,2	83	152	172	17,1	75	15,5	46
20	30,4	112	152	265	17,5	88	16,9	55
30	30	139	152	332	18	103	17,4	62
40	30,5	167	151	390	18	113	17,9	71
50	31	210	151	450	18,1	119	18	80
60	31,4	240	151	470	19	124	18	85

Примечание: 1 – контроль (иммобилизованные клетки без АА), 2 – иммобилизованные клетки с АА

Изучена динамика изменения электропроводности при трансформации 5–100 мМ АА в АК биоселектирующим агентом на основе клеток *A. faecalis* 2, иммобилизованных в структуре геля агарозы. Установлено, что в течение 1 ч увеличение электропроводности для всех изученных концентраций АА происходит линейно, предел определения составлял 10^{-3} М. На основании проведенных последовательных циклов трансформации АА в АК иммобилизованными клетками амидазосодержащих бактерий и расчетов суммарного времени работы биокатализатора с сохранением не менее 50% первоначальной ферментативной активности было установлено, что время полужизни такого биоселектирующего агента может достигать 500 ч.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние АА на различные показатели физиологического состояния бактериальной клетки, такие как содержание внутриклеточного АТФ, дыхательную активность и выживаемость на среде с АА, мутагенную активность по отношению к индикаторным штаммам, люминесценцию генно-модифицированного штамма и амидазную активность бактерий родов *Rhodococcus* и *Alcaligenes*, с целью оценки последних как биотехнологических объектов. Был выбран подходящий штамм бактерий, который может быть использован в качестве биологического элемента для разработки биосенсора на определение данного загрязняющего вещества, получения устойчивого сигнала и долговременной работы этого

аналитического устройства. Изучены методы и носители для иммобилизации каталитически активных клеток, которые позволят сохранить их ферментативную активность и обеспечить многоразовое использование микробного сенсора на АА.

Изучено влияние АА на энергетический статус бактериальных клеток *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. erythropolis* 6-21, *R. ruber* gt 1 и *A. faecalis* 2. У ряда штаммов было выявлено снижение концентрации АТФ в клетке по сравнению с контролем. Наиболее устойчивым к воздействию высоких концентраций АА являлся *R. ruber* gt 1, обладающий высокой нитрилгидратазной активностью. У наиболее чувствительных к этому веществу *A. faecalis* 2 и *R. erythropolis* 6-21 АА не приводил к ингибированию метаболизма даже в концентрации 1 М.

Изучено влияние 5–500 мМ АА на амидазную активность штаммов *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2. При увеличении концентрации АА до 500 мМ наблюдалось постепенное возрастание активности фермента штамма *R. erythropolis* 4-1 и отсутствие его ингибирования. Ферментативная активность клеток *A. faecalis* 2 возрастала практически линейно при увеличении концентрации субстрата до 100 мМ АА, после чего оставалась постоянной до 250 мМ АА с незначительным постепенным снижением.

Изучено влияние АА в концентрации 10–1500 мМ на люминесценцию генно-модифицированного штамма *E. coli* K12 TG1 (pXen7), который используется в качестве сенсора на токсичные вещества. Показано, что гашение люминесценции имеет прямую зависимость от времени воздействия и концентрации АА. Однако использование *E. coli* K12 TG1 (pXen7) в качестве тест-системы для мониторинга АА является нецелесообразным из-за отсутствия специфичности к этому соединению.

Изучена жизнеспособность *R. erythropolis* 6-21, *R. ruber* gt 1, *R. erythropolis* 11-2, *A. faecalis* 2, *E. coli* K12 и *E. coli* K12 TG1 (pXen7) на полноценной питательной среде, содержащей АА в концентрации 10–1000 мМ. Было выявлено ингибирование роста в присутствии АА в концентрации от 500 мМ и выше у большинства штаммов, кроме *R. erythropolis* 11-2.

Изучена дыхательная активность клеток штаммов *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. ruber* gt 1 и *A. faecalis* 2 при воздействии 10–1000 мМ АА. Показано, что клетки родококков сохраняют метаболическую активность даже в присутствии высоких концентраций АА.

Изучена бактерицидность и мутагенная активность АА методом стандартного теста Эймса без микросомальной фракции. Показано, что в такой системе АА не проявляет мутагенного эффекта. Следует отметить, что это соединение не является высокотоксичным для бактерий. Токсические свойства АА проявляются, главным образом, по отношению к эукариотическим организмам, а не прокариотам.

Таким образом, АА только в высоких концентрациях вызывает снижение жизнеспособности и метаболической активности у большинства штаммов. Использование генно-модифицированного штамма *E. coli* K12 TG1 (pXen7) в качестве тест-системы для мониторинга АА нецелесообразно из-за отсутствия специфичности к этому соединению. На основании проведенных экспериментов был сделан вывод о необходимости разработки биосенсора на АА, обладающего специфичностью и чувствительностью к АА.

Поиск микроорганизмов, которые могли бы частично или полностью разлагать ПАА и его производные, является непростой задачей из-за особенностей строения полимеров, а также

возможной токсичности АА в их составе. В настоящей работе изучена способность бактериальных штаммов *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2, обладающих амидазной активностью, использовать линейные катионные, анионные и неионогенный ПАА в качестве углеродного, азотного питания и единственного ростового субстрата. Выявлено, что амидазосодержащие штаммы могут деградировать данные ПАА, используя их в качестве субстрата для роста, например, в качестве источника азота с дополнительным источником углерода. Показано, что эффективность микробной деградации ПАА зависит от его заряда. При росте амидазосодержащих бактерий с ПАА, как источниками С и/или N, изменяется вязкость полимеров, однако, это изменение не имеет четкой корреляции с накоплением биомассы бактерий. В перспективе данные штаммы могут быть применены для утилизации избытков отработанного полимера.

Изучена эффективность иммобилизации амидазосодержащих клеток бактерий *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 включением в структуру гелей альгината бария, агарозы и κ-каррагинана, на неактивированном и активированном хитозане и на терморасширенном графите и определена операционная стабильность иммобилизованных биокатализаторов. Установлено, что бактериальные клетки с амидазной активностью, иммобилизованные в структуру гелей альгината бария с МУНТ или без нанотрубок, геля агарозы, либо выращенные в виде биопленок на ТРГ, могут служить основой биологического элемента при разработке прототипа кондуктометрического биосенсора. При этом наилучшими характеристиками для разработки биосенсора обладали клетки *A. faecalis* 2, иммобилизованные в структуре геля агарозы.

Показано, что биокатализаторы на основе клеток *A. faecalis* 2 способны долговременно храниться как во влажном состоянии при температуре от 4 до 25°C, так и при замораживании от -20 до -80°C.

Разработан прототип биосенсора на АА на основе амидазосодержащих бактериальных клеток, иммобилизованных на кондуктометрическом электроде. Принцип работы биосенсора заключается в трансформации АА в АК внутриклеточной амидазой и определении роста электропроводности раствора при увеличении концентрации АК.

Показано, что амидазосодержащие бактерии устойчивы к высоким концентрациям АА и являются основой биотехнологий, связанных с его использованием. Так, эти бактерии могут использоваться в биокатализе для синтеза АК (Полтавская и др., 2004; Дебабов, Яненко, 2011; Максимова и др., 2015; Максимова, Якимова, Максимов, 2019; Sharma, Sharma, Bhalla, 2009; Kamal *et al.*, 2011; Тере, 2015). В данной работе показано, что *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 с амидазной активностью способны расти с использованием ПАА в качестве субстрата и перспективны для биodeградации отработанного полимера, а также иммобилизованные клетки этих бактерий могут служить основой биодетекции АА в жидких средах.

Перспективой дальнейшей разработки темы диссертационного исследования является изучение воздействия АА на экспрессию генов, связанных с ответом на окислительный стресс у бактерий, а также совершенствование биотехнологического процесса биodeградации отработанных ПАА.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что эффективная концентрация, вызывающая половину максимального эффекта (EC₅₀) акриламида по отношению к прокариотам, составляет 7108 мг/л при воздействии в течение 120 мин. АА в концентрации ниже 500 мМ не вызывает подавление роста у бактерий родов *Rhodococcus* и *Alcaligenes* на полноценной питательной среде культивирования. Снижение концентрации внутриклеточного АТФ в клетке под воздействием 20–1000 мМ АА достоверно у *A. faecalis* 2 и *R. erythropolis* 6-21; наиболее устойчивым штаммом является *R. ruber* gt 1 (снижение содержания АТФ не наблюдается). Показано, что АА не обладает выраженным бактерицидным действием и генотоксичностью по отношению к индикаторным штаммам *S. typhimurium* TA1535 и TA1538.
2. Определено, что высокие концентрации АА не приводят к ингибированию амидазной активности изученных бактерий. *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 способны использовать линейные катионные, анионные и неионогенный ПАА в качестве ростового субстрата. Показано, что катионные и неионогенный ПАА подвержены более эффективной микробной трансформации.
3. Выявлено, что наибольшее количество АК (70–100 мг за реакцию) образуется при многократной трансформации АА (18 циклов) биокатализатором на основе клеток *A. faecalis* 2 (4,3 мг), иммобилизованных в структуру геля альгината бария. Показано, что хитозан и κ-каррагинан образуют менее стабильную матрицу для иммобилизации бактериальных клеток по сравнению с альгинатом и агарозой, при этом агароза механически более прочная, чем альгинат, тогда как прочность альгината может быть увеличена при введении в матрицу углеродных нанотрубок. Клетки *A. faecalis* 2, включенные в гель агарозы, трансформируют АА на протяжении 18 циклов без снижения амидазной активности. Установлено, что амидазная активность биопленок *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ сохранялась на протяжении 30 проведенных циклов, а *R. erythropolis* 4-1 – 5 циклов. Показано, что наибольшее количество АК (100–120 и 80–100 мг) образовывалось при трансформации АА биокатализаторами на основе выращенных на 0,5 г ТРГ биопленок *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 соответственно.
4. Определено, что оптимальным способом хранения иммобилизованных биокатализаторов на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру геля агарозы и альгината бария, является их замораживание при –20 ... –80°С или охлаждение до +4–6°С. После размораживания исходная амидазная активность не снижалась на протяжении 7 циклов.
5. Разработан прототип кондуктометрического биосенсора на АА на основе иммобилизованных в структуре агарозы и альгината бария амидазосодержащих клеток *A. faecalis* 2, *R. erythropolis* 11-2 и *R. erythropolis* 4-1. Установлено, что наилучшими характеристиками обладал биоселектирующий агент на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру геля агарозы. Показано, что в течение 1 ч увеличение электропроводности раствора происходило линейно при концентрации АА 5–100 мМ, предел определения составлял 10⁻³ М, время полужизни биоселектирующего агента – не менее 500 ч.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Максимова, Ю.Г. Влияние акриламида на энергетическое состояние и выживаемость бактерий разных систематических групп / Ю.Г. Максимова, Е.М. Мочалова (Протасова), В.А. Демаков // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 492. – С. 255–259. (Scopus, WoS)
2. Мочалова (Протасова), Е.М. Иммобилизация клеток нитрилгидролизующих бактерий *Rhodococcus erythropolis* 4-1 и *Alcaligenes faecalis* 2 с использованием термотропных и ионотропных гелей / Е.М. Мочалова (Протасова), Ю.Г. Максимова // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2020. – № 1. – С. 26–32. (ВАК)
3. Protasova, E.M. Development of a bio-selecting agent based on immobilized bacterial cells with amidase activity for bio-detection of acrylamide / E.M. Protasova, Yu.G. Maksimova // Appl. Biochem. Microbiol. – 2024. – V. 60, № 5. – P. 942–949. (Scopus, WoS)
4. Протасова, Е.М. Биодegradация линейных полиакриламидов амидазосодержащими бактериями / Е.М. Протасова // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2025. – № 1. – С. 43–48. (ВАК)

Патентные документы

Пат. 2830305 Российская Федерация, МПК7 G01N 27/26 (2006.01), C12N 11/04 (2006.01). Способ биодетекции акриламида иммобилизованными клетками амидазосодержащих бактерий / Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Протасова Е.М. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН). – № 2024107566; заявл. 22.03.2024 ; опубл. 18.11.2024, Бюл. № 32. – 12 с. : ил.

Публикации в других журналах и сборниках

5. Мочалова (Протасова), Е.М. Влияние акриламида на биолюминесценцию *Escherichia coli* K12 TG1 (pXen7) / Е.М. Мочалова (Протасова), Ю.Г. Максимова // «Биология – наука XXI века». Сборник тезисов 22-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых. – Пушино: ФГБУН Пушинский научный центр РАН, 2018. – С. 300.
6. Максимова, Ю.Г. Способы определения акриламида в окружающей среде / Ю.Г. Максимова, Е.М. Мочалова (Протасова), В.А. Демаков // «Высокие технологии, определяющие качество жизни». Материалы II Международной научной конференции. – Пермь: ПГНИУ, 2018. – С. 86–88.
7. Мочалова (Протасова), Е.М. Оценка генотоксичности акриламида и его влияния на жизнеспособность и метаболическую активность бактерий / Е.М. Мочалова (Протасова), Ю.Г. Максимова // «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования». Сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием. – Пермь: ПГНИУ, 2021. – С. 76–79.
8. Максимова, Ю.Г. Иммобилизованные бактериальные клетки в биотехнологических процессах / Ю.Г. Максимова, А.С. Зорина, Е.М. Мочалова (Протасова), А.Ю. Максимов, В.А. Щетко // Актуальная биотехнология. – 2021. – № 1 (35). – С. 296–299.

9. Мочалова (Протасова), Е.М. Иммобилизация клеток амидазосодержащих бактерий на терморасширенном графите / Е.М. Мочалова (Протасова), Ю.Г. Максимова // «Биология – наука XXI века». Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием. – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – С. 170–171.
10. Мочалова (Протасова), Е.М. Биодegradация линейных полиакриламидов амидазосодержащими бактериями / Е.М. Мочалова (Протасова), Ю.Г. Максимова // «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Материалы XIII Международной научной конференции. – Минск: Институт микробиологии НАН Беларуси, 2023. – С. 436–437.
11. Протасова, Е.М. Биодegradация линейных полиакриламидов амидазосодержащими бактериями / Е.М. Протасова, Ю.Г. Максимова // «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Сборник научных трудов. – 2023 – Т. 15. – С. 543–550.
12. Протасова, Е.М. Иммобилизация бактериальных клеток на терморасширенном графите / Е.М. Протасова, Ю.Г. Максимова // «Фундаментальные и прикладные аспекты биологии». Сборник статей Международной конференции ученых-биологов. – Пермь: ПГНИУ, 2024. – С. 97–102.
13. Протасова, Е.М. Иммобилизация клеток *Alcaligenes faecalis* 2 включением в структуру альгинатного геля с углеродными нанотрубками / Е.М. Протасова, Ю.Г. Максимова // «Биология – наука XXI века». Сборник тезисов 27-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием. – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2024. – С. 220.
14. Протасова, Е.М. Иммобилизация амидазосодержащих бактерий для биодетекции акриламида / Е.М. Протасова, Ю.Г. Максимова // «Инновационные биотехнологии для охраны окружающей среды: от теории к практике». Материалы I Международной научно-практической конференции. – Минск: Институт микробиологии НАН Беларуси, 2024. – С. 254–256.
15. Протасова, Е.М. Разработка прототипа биосенсора и биотестирование токсичности сред, содержащих акриламид / Е.М. Протасова, Ю.Г. Максимова // «Экологическая безопасность в условиях антропогенной трансформации природной среды». Материалы XX-ой Всероссийской научной конференции молодых ученых с международным участием, посвященной памяти Г.А. Воронова, Н.Ф. Реймерса и Ф.Р. Штильмарка. – Пермь: ПГНИУ, 2025. – С. 292–296.

ПРОТАСОВА Елена Михайловна

ВЛИЯНИЕ АКРИЛАМИДА НА АМИДАЗОСОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИИ РОДОВ
ALCALIGENES И *RHODOCOCCLUS* И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ БИОДЕТЕКЦИИ
ЭТОГО ТОКСИКАНТА

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать ____ . ____ . ____ . Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз. Заказ.

Набор компьютерный.

Отпечатано в «Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук» – филиале Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения
Российской академии наук
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13