

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ПЕРМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
«ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ УРАЛЬСКОГО  
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

**Протасова Елена Михайловна**

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

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, доцент  
**Максимова Юлия Геннадьевна**

Пермь – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ                                                                                    | 5  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ                                                                   | 17 |
| 1.1. Акриламид в окружающей среде                                                           | 17 |
| 1.1.1. Токсические эффекты акриламида                                                       | 21 |
| 1.1.2. Деградация акриламида и полиакриламида                                               | 24 |
| 1.2. Методы определения акриламида в окружающей среде и пище                                | 28 |
| 1.2.1. Биосенсоры на определение акриламида                                                 | 30 |
| 1.3. Иммобилизация клеток микроорганизмов в биосенсорах                                     | 34 |
| 1.4. Влияние акриламида на микроорганизмы                                                   | 37 |
| 1.5. Трансформация акриламида у микроорганизмов                                             | 37 |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ                                                      | 43 |
| 2.1. Бактериальные штаммы                                                                   | 43 |
| 2.2. Среды, условия культивирования бактерий и определение ростовых характеристик           | 43 |
| 2.3. Определение амидазной активности бактериальных штаммов                                 | 44 |
| 2.4. Определение концентрации АТФ биолюминесцентным методом при воздействии акриламида      | 45 |
| 2.5. Определение биолюминесценции <i>E. coli</i> K12 TG1 (pXen7) при воздействии акриламида | 46 |
| 2.6. Определение выживаемости бактерий в присутствии акриламида                             | 46 |
| 2.7. Определение дыхательной активности бактериальных клеток при воздействии акриламида     | 47 |
| 2.8. Определение мутагенного действия акриламида на штаммы <i>Salmonella typhimurium</i>    | 47 |
| 2.9. Определение роста бактерий на среде с линейными полиакриламидами                       | 49 |
| 2.10. Иммобилизация бактериальных клеток методом включения в структуру геля                 | 50 |
| 2.10.1. Включение бактериальных клеток в структуру агарозного геля                          | 50 |

|                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.10.2. Включение бактериальных клеток в структуру геля альгината бария                                                                                                                       | 50 |
| 2.10.3. Включение бактериальных клеток в структуру геля κ-каррагинана                                                                                                                         | 51 |
| 2.11. Иммобилизация бактериальных клеток на неактивированном и активированном хитозане                                                                                                        | 51 |
| 2.12. Иммобилизация бактериальных клеток на терморасширенном графите                                                                                                                          | 52 |
| 2.13. Определение операционной стабильности иммобилизованного биокатализатора                                                                                                                 | 53 |
| 2.14. Определение электропроводности раствора с иммобилизованными биокатализаторами                                                                                                           | 53 |
| 2.15. Статистическая обработка результатов                                                                                                                                                    | 54 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ                                                                                                                                                              | 55 |
| 3.1. Влияние акриламида на энергетический статус клеток бактерий родов <i>Rhodococcus</i> и <i>Alcaligenes</i>                                                                                | 55 |
| 3.2. Зависимость активности амидазы <i>R. erythropolis</i> 4-1 и <i>A. faecalis</i> 2 от концентрации акриламида                                                                              | 58 |
| 3.3. Влияние акриламида на биолюминесценцию <i>E. coli</i> K12 TG1 (pXen7)                                                                                                                    | 60 |
| 3.4. Рост бактерий разных систематических групп на среде, содержащей акриламид                                                                                                                | 63 |
| 3.5. Воздействие акриламида на дыхательную активность штаммов <i>Rhodococcus</i> и <i>A. faecalis</i> 2                                                                                       | 65 |
| 3.6. Определение мутагенного действия акриламида на штаммы <i>Salmonella typhimurium</i>                                                                                                      | 66 |
| 3.7. Культивирование бактерий <i>R. erythropolis</i> ИЛ БИО и <i>A. faecalis</i> 2 на среде с линейными полиакриламидами                                                                      | 68 |
| 3.8. Операционная стабильность иммобилизованных биокатализаторов <i>R. erythropolis</i> 4-1 и <i>A. faecalis</i> 2                                                                            | 75 |
| 3.9. Операционная стабильность биокатализаторов на основе клеток <i>R. erythropolis</i> 4-1, <i>R. erythropolis</i> 11-2 и <i>A. faecalis</i> 2, иммобилизованных на терморасширенном графите | 82 |

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.10. Операционная стабильность иммобилизованного амидазосодержащего биокатализатора после длительного хранения в различных условиях | 85  |
| 3.11. Разработка прототипа кондуктометрического биосенсора на акриламид                                                              | 88  |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ                                                                                                                           | 92  |
| ВЫВОДЫ                                                                                                                               | 99  |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ                                                                                                                    | 101 |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

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, токсичными 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; Tere, Çebi, 2019). Акриламид находит промышленное применение как мономер для производства акриловых полимеров и пластмасс, используемых в качестве связующего агента в цементных растворах и мембранах для очистки сточных вод в качестве флокулянта, загустителя в составах пестицидов, для предотвращения эрозии почвы, в переработке руды, нефтегазовой промышленности, производстве бумаги, декоративной косметики, продуктов по уходу за кожей и волосами, лаков и 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%. Основной источник загрязнения вод акриламидом – производства по получению акриламида из акрилонитрила, 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, после флокуляции с ПАА, 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).

В большинстве случаев акриловые полимеры, такие как ПАА, 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 могут являться причиной загрязнения окружающей среды (Jangkorn, Charoenpanich, Sriwiriyarat, 2018).

Одним из путей образования акриламида является высокотемпературная обработка богатой углеводами пищи, содержащей природную аминокислоту аспарагин и редуцирующие сахара, известным как реакция Майяра (Нилова, Малютенкова, Вытовтов, 2017; Wampler, Ensign, 2005; Pan *et al.*, 2020). Факторы, которые влияют на образование и концентрацию акриламида в продуктах питания, включают температуру и продолжительность термической обработки, а также содержание аминокислот, воды, углеводов и концентрации исходного сырья (Demirhan *et al.*, 2018; Pundir, Yadav, Chhillar, 2019). Чем выше температура обработки и дольше время экспозиции, тем эффективнее реакция Майяра и разложение крахмала на простые сахара (включая D-глюкозу). D-глюкоза может быть также получена при кислотном гидролизе глюканов, присутствующих в пище, и является одним из предшественников акриламида. При высокой температуре образуются 3-углеродные молекулы и различные промежуточные продукты реакции, что и может привести к образованию акриламида (Duda-Chodak *et al.*, 2016).

Несмотря на высокую токсичность этого вещества некоторые микроорганизмы могут использовать его в качестве единственного источника углерода и/или азота (Wampler, Ensign, 2005; Gafar *et al.*, 2017; Gafar, Shukor, 2018). Известно, что штаммы бактерий, относящиеся к родам *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Stenotrophomonas* и др., способны к биодеградации акриламида в окружающей среде (Jebasingh *et al.*, 2013; Lakshmikandan *et al.*, 2014; Joshi, Abed, 2017; Jangkorn,

Charoenpanich, Sriwiriyarat, 2018). Некоторые грибы и дрожжи могут разлагать 60–80% акриламида. Например, *Phanerochaete chrysosporium* VKMF-1767, возбудитель белой гнили; нитчатые грибы, такие как *Aspergillus oryzae* KBN1010, *A. terreus* NRRL1960; дрожжи, такие как *Rhodotorula* sp. MBH23, *Saccharomyces cerevisiae* (Joshi, Abed, 2017). Однако акриламид подвергается наиболее эффективной деградации бактериями, а не дрожжами. Этот процесс регулируется действием фермента амидазы (акриламидамидогидролазы), которая катализирует гидролиз этого соединения до образования аммиака и акриловой кислоты (Тере, 2015). Тем не менее, характер токсического действия акриламида на физиологию прокариотов остается не до конца выясненным. Помимо амидазного пути гидролиза акриламида, существует и нитрилгидратазно-амидазный. Нитрилгидратазный путь основан на гидролизе нитрилов (в частности, акрилонитрила) в соответствующие амиды (в частности, акриламида) с помощью фермента нитрилгидратазы. Последующее превращение амидов до кислоты и аммиака происходит с помощью фермента амидазы (Дебабов, Яненко, 2011).

Контроль над содержанием этого соединения в окружающей среде и продуктах питания необходим в связи с его токсичностью по отношению к человеку и животным и требует совершенствования методов его детекции. Традиционными методами определения акриламида являются хроматографические (ВЭЖХ, ГХ и ЖХ) с их модификациями (Rosén, Hellenäs, 2002; Kepekci Tekkeli, Önal C., Önal A., 2012; Lobsiger, Stark, 2019; Tepe, Çebi, 2019; Pundir, Yadav, Chhillar, 2019; Pan *et al.*, 2020). Как альтернатива традиционным методам анализа может быть предложена 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 различных принципах: 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: дороговизна, сложность технического исполнения, недолговечность или использование непростого в получении и эксплуатации биологического агента. Для создания такого аналитического устройства необходимо всесторонне изучить физиологический ответ бактериальной клетки на воздействие акриламида, выбрать подходящие методы и носители для иммобилизации, которые позволят сохранить ферментативную активность клеток бактерий и обеспечить долговременное использование микробного сенсора на акриламид.

Исследование жизнеспособности и ростовых характеристик бактерий при воздействии акриламида, мутагенной активности акриламида, амидазной и дыхательной активности, энергетического состояния клеток при экспозиции с этим токсикантом позволяет получить новые знания, касающиеся изменений физиологического состояния прокариотов под воздействием ксенобиотического вещества, выбрать бактериальные штаммы, имеющие перспективу использования в качестве биологического элемента биосенсора на акриламид и разработать научные основы конструирования такого устройства.

Помимо этого, активное использование ПАА в очистке сточных вод требует решения задачи утилизации отработанных полимеров. Биodeградация является экономически эффективным и экологичным методом очистки окружающей среды от ксенобиотиков и органических поллютантов (Caulfield *et al.*, 2003; Guezennec *et al.*, 2015; Nyuysölä, Ahlgren, 2019). Однако 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 акриламида в их составе.

Таким образом, контроль за содержанием акриламида в водных объектах и пищевых продуктах является крайне важным и требует разработки методов и

устройств для быстрого и селективного определения этого токсичного вещества, а широкое использование ПАА ставит задачу утилизации отработанных полимеров. В связи с этим представляется актуальным изучение физиологических и биохимических особенностей амидазосодержащих бактерий для их применения в процессах биодетекции акриламида и биodeградации полимеров этого вещества.

### **Состояние вопроса**

Вследствие широкого промышленного применения и токсичности акриламида существуют различные аналитические методы его обнаружения и количественного определения в пищевых продуктах (Куликовский и др., 2019; Wenzl, De La Calle, Anklam, 2003; Tepe, 2015) и водных образцах (Россинская и др., 2008; Кремко, Саракач, Докутович, 2012). Наиболее распространёнными методами являются хроматографические, такие как газовая и высокоэффективная жидкостная хроматографии (ГХ и ВЭЖХ) с масс-спектрометрией (ГХ–МС и ВЭЖХ–МС) или tandemной масс-спектрометрией (ГХ–МС/МС и ВЭЖХ–МС/МС) (Лопушанская, Максакова, Крылов, 2017; Куликовский и др., 2019; Kerekeci Tekkeli, Önal S., Önal A., 2012; Pundir, Yadav, Chhillar, 2019; Pan *et al.*, 2020). Также применяют жидкостную хроматографию с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ–МС/МС) (Rosén, Hellenäs, 2002) и жидкостную хроматографию гидрофильных взаимодействий с масс-спектрометрией (Lobsiger, Stark, 2019; Tepe, Çebi, 2019).

Кроме хроматографических методов анализа, ряд исследователей предлагают и другие, например, основанные на измерении флуоресценции химически модифицированного акриламида (Hu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Demirhan *et al.*, 2018); метод дифференциальной импульсной полярографии (Кремко, Саракач, Докутович, 2011; Hu *et al.*, 2015); капиллярный электрофорез (Silva *et al.*, 2009) и иммуноферментные анализы (Oracz, Nebesny, Zyżelewicz, 2011; Zhu *et al.*, 2016).

Однако определение этого загрязняющего вещества высокоточными аналитическими методами требует специального оборудования, лабораторных условий, обученного персонала и затрат времени (Pundir, Yadav, Chhillar, 2019). Альтернативным подходом является использование биосенсоров. Известно, что

биодатчики обладают высокой чувствительностью, способны к быстрому и специфичному ответу на присутствие токсиканта в среде, не требуют специальных условий, специально обученного персонала, больших временных затрат, реагентов и растворителей (Мамичев и др., 2012; Rotariu *et al.*, 2016; Shoaie *et al.*, 2019).

Известны биосенсоры для определения акриламида на основе респираторной активности клеток *Brevibacterium* sp. (Ignatov *et al.*, 1997); на основе пастообразного углеродного электрода, модифицированного с гемоглобином (Stobiecka, Radecka, Radecki, 2007); на основе золотого электрода, модифицированного одноцепочечной ДНК (Huang *et al.*, 2016); не содержащий метки электрохимический биосенсор на основе ДНК, иммобилизованной на стеклообразном углеродном электроде, модифицированном оксидом графена (Li *et al.*, 2014); на основе стеклянных углеродных электродов, модифицированных однослойными углеродными нанотрубками и гемоглобином (Krajewska, Radecki, Radecka, 2008), на основе ковалентной иммобилизации гемоглобина на нанокompозите из карбоксилированных многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ-COOH), наночастиц меди и полианилина, электроосажденных на электроде из графита (Batra *et al.*, 2013), на основе ковалентной иммобилизации наночастиц гемоглобина на поликристаллическом золотом электроде (Yadav, Chhillar, Pundir, 2018), а также на основе ковалентно иммобилизованного гемоглобина на нанокompозите, состоящем из МУНТ и наночастиц оксида железа, электроосажденных на золотом электроде через пленку хитозана (Batra, Lata, Pundir, 2013), а также на основе амидазосодержащих клеток *P. aeruginosa* (Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). В большинстве представленных биосенсоров на акриламид не используются целые клетки микроорганизмов, обладающих амидазной активностью, за исключением работы Сильвы и др. Тем не менее, этот датчик обладает рядом недостатков, такими как использование специального ионоселективного электрода, высушивание клеток на дисках полимерных мембран, приводящее к их возможному смыванию с электрода и потере активности фермента, а также использование условно-патогенных бактерий в качестве биологического элемента.

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, тем самым, их биodeградация, по-видимому, инициируется внеклеточными амидазами либо в аэробных, либо в анаэробных условиях, и далее они частично или полностью разлагаются массивом различных ферментов (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).

Токсичность акриламида в отношении высших организмов широко известна. Тем не менее, в литературе практически не содержится сведений о влиянии акриламида на физиологические особенности клеток бактерий и степени токсичности этого вещества по отношению к прокариотам, и более того, недостаточно работ, посвященных возможности биоразложения ПАА и использования бактериями линейных полимеров акриламида в качестве субстрата

роста. А также отсутствуют работы, посвященные использованию простого и дешевого портативного анализатора акриламида, основанного на использовании бактерий, не проявляющих потенциальной патогенности. Необходим выбор способа иммобилизации, который позволит долговременно и многократно проводить измерения, а также обеспечит сохранение активности при различных способах хранения биоселектирующего агента.

**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  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

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 акриламиду, 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 долговременном хранении и являются стабильным биоселектирующим агентом для кондуктометрического определения акриламида в среде с пределом  $10^{-3}$  М и временем полужизни не менее 500 ч.

#### **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.

#### **Апробация работы и публикации**

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 14 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 10 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.

**Список принятых сокращений:** АА – акриламид; АК – акриловая кислота; АТФ – аденозинтрифосфат; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГА – глицидамид; ГХ – газовая хроматография; ЖХ – жидкостная хроматография; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан; КОЕ – колониеобразующая единица; МС – масс-спектрометрия; МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки; НАДН – никотинамидадениндинуклеотид; НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; ОП – оптическая плотность; , ПАА – полиакриламид; СЧВ – сверхчистая вода; ТРГ – терморасширенный графит; ХТТ – 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфобензил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Акриламид в окружающей среде

Акриламид (АА,  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) – ненасыщенный амид акриловой кислоты, используемый для синтеза различных полимеров, например, ПАА (Charoenpanich, 2013; Gafar *et al.*, 2017; Madmanang *et al.*, 2019).

АА представляет собой полярную молекулу небольшого размера с молекулярной массой 71,08 г/моль (Zhu *et al.*, 2016). Имеет вид белого, бледно-желтого или прозрачного кристаллического вещества без запаха при комнатной температуре. Растворяется в воде, метаноле, этаноле, диметиловом эфире и ацетоне, но мало растворим в бензоле и гептане (Charoenpanich, 2013; Тере, Çebi, 2019). Имеет низкую испаряемость, обладает высокой подвижностью в водных средах, а также легко вымывается из почвы (Тере, 2015; Nada, Ali, Ingolf, 2018). Высокая реакционная способность АА основана на его двойной углерод-углеродной связи и амидной группе, что позволяет ему реагировать как с амидной, так и с винильной группами (Demirhan *et al.*, 2018).

В апреле 2002 года появились данные, что АА содержится в некоторых продуктах питания, богатых углеводами, которые подвергались термической обработке, такой как запекание или жарка, а также при варке некоторых овощей и фруктов (Batra, Pundir, 2016; Duda-Chodak *et al.*, 2016). Основным механизмом образования АА в пищевых продуктах является реакция Майяра между восстанавливающими сахарами (глюкозой, фруктозой) и белками/аминокислотами (особенно аспарагинами) при температурах выше 120°C (Charoenpanich, 2013; Li *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2018).

Факторы, влияющие на образование и концентрацию АА в продуктах питания, включают температуру и продолжительность термической обработки, а также содержание аминокислот, воды и углеводов, концентрации исходного сырья (Demirhan *et al.*, 2018; Pundir, Yadav, Chhillar, 2019).

Чем выше температура обработки и дольше время экспозиции, тем эффективнее реакция Майяра и разложение крахмала на простые сахара (включая

D-глюкозу). D-глюкоза может быть также получена при кислотном гидролизе глюканов, присутствующих в пище, и является одним из предшественников АА. При высокой температуре образуются 3-углеродные молекулы и различные промежуточные продукты реакции, что и может привести к образованию АА (Duda-Chodak *et al.*, 2016).

Высокое содержание этого соединения было обнаружено в таких крахмалистых продуктах, как картофельные чипсы, картофель фри, жареный картофель, жареные кофейные зерна (Arvanitoyannis, Dionisopoulou, 2014; Batra, Pundir, 2016; Sansano *et al.*, 2017). Помимо этого, АА найден в хлебе, хлебцах, тостовом хлебе, печенье, шоколаде, сухих завтраках, кукурузных чипсах и прочих зерновых (Нилова, Малютенкова, Вытовтов, 2017; Arvanitoyannis, Dionisopoulou, 2014). Продукты, богатые белком (из рыбы, мяса или птицы), содержат небольшое количество этого соединения (5–50 мкг/кг) (Pundir, Yadav, Chhillar, 2019).

Было продемонстрировано, что концентрация АА в печенье, приготовленном с использованием 20% воды, была примерно в два раза выше, чем в печенье, приготовленном с 10% и 15% воды. Это можно объяснить тем, что низкий уровень влажности в пище может снизить растворимость питательных веществ и ограничивает мобильность реакционных субстратов, что приводит к сокращению образования АА (Duda-Chodak *et al.*, 2016).

Помимо реакции Майяра, АА может образовываться в термически обработанных пищевых продуктах, богатых аспарагином в отсутствие восстанавливающих сахаров – это так называемый путь акролеина. Акролеин и акриловая кислота образуются через дегградацию жиров, за которыми следует дегидратация глицерина, и они дают АА в реакции с аммиаком. Другими путями образования являются ферментативное декарбоксилирование аспарагина, превращение липидов, термическое разложение аминокислот, белков и углеводов и т.д. (Charoenpanich, 2013; Duda-Chodak *et al.*, 2016).

К промышленным способам получения АА относят серноокислотный, каталитический и биокаталитический. Во всех трех способах АА образуется при гидратации акрилонитрила (Дебабов, Яненко, 2011; Gafar *et al.*, 2017).

И сернокислотный (устаревший) и Cu-каталитический (наиболее распространенный в мире) обладают значительными недостатками. Первый метод больше не используется для коммерческого производства АА, поскольку он приводит к образованию сульфата и другим побочным продуктам (Gafar *et al.*, 2017). АА, полученный гидратацией акрилонитрила на медно-никелевых катализаторах, содержит в качестве основных примесей ионы металлов переходной валентности (от растворения катализатора), акриловую кислоту и побочные продукты реакции по двойной связи акрилонитрила и АА. Для получения растворов АА высокого качества требуется многоступенчатая очистка от остаточного акрилонитрила, ионов металлов и побочных продуктов. Общим недостатком как сернокислотного, так и каталитического методов является получение разбавленных (6–20%-ных) водных растворов АА, требующих дорогостоящего вакуумного концентрирования до принятой в мире стандартной товарной формы – 40 или 50%-ных растворов АА. Кроме того, для традиционных процессов характерным является образование значительных количеств стоков за счет регенерации применяемых в процессе очистки ионообменных смол, высокие капитальные вложения по созданию или реконструкции действующих производств, а также сложность самого технологического процесса (Дебабов, Яненко, 2011).

Биокаталитический метод основан на применении в качестве катализаторов гидролиза акрилонитрила микробных клеток, обладающих высокой нитрилгидратазной активностью. Предпосылки для развития этого метода появились в 70-х годах, когда был изолирован штамм бактерий *Brevibacterium* sp. R312, обладавший способностью трансформировать нитрилы в амиды. В настоящее время в мире уже свыше 25% АА производится с помощью биокатализа (в Китае – свыше 40%) (Дебабов, Яненко, 2011).

Таким образом, биокаталитический способ получения АА выгодно отличается от разработанных ранее традиционных химических способов – сернокислотного и каталитического, высокой степенью селективности и конверсии гидратации акрилонитрила, мягкими условиями проведения процесса, чистотой

получаемого продукта, низкими энергетическими затратами, экологической безопасностью. Тенденция замещения традиционной технологии получения АА на биокаталитическую стала устойчивой и необратимой. В настоящее время биотехнологический метод получения АА используется уже в четырех странах – Японии, России, Китае и Южной Корее (Дебабов, Яненко, 2011).

Биокатализаторы, разработанные для получения АА, вследствие широкой специфичности ферментов нашли применение для получения других амидов (Дебабов, Яненко, 2011; Sharma, Sharma, Bhalla, 2009).

Этот мономер используются во всем мире для синтеза ПАА и других акриловых полимеров (Charoenpanich, 2013). ПАА и его производные могут иметь различную молекулярную массу и плотность заряда при изменении параметров реакции полимеризации и/или относительных количеств используемых реагентов. Высокомолекулярные водорастворимые полимеры могут быть модифицированы для придания им неионогенных, анионных или катионных свойств для конкретных целей (Guezennec *et al.*, 2015).

Отрасли использования полимеров на основе АА – нефтегазовая, горнорудная, строительная, целлюлозно-бумажная, текстильная, фармакологическая, медицинская, сельскохозяйственная и др. (Аликин и др., 2005; Jiang *et al.*, 2019; Uranta *et al.*, 2019).

В большинстве случаев эти полимеры используют в качестве флокулянтов, которые способствуют эффективному разделению твердой и жидкой фаз в воде, содержащей взвешенные вещества (Eş, Vieira, Amaral, 2015; Wei *et al.*, 2018). ПАА в промышленных масштабах используют для очистки сточных вод. Его применяют в качестве обезвоживающего агента для предварительной обработки осадка перед механическим обезвоживанием (Akbar, Khan, Abid, 2022). В водном хозяйстве ежегодно тратятся миллионы долларов на удаление токсичных загрязнителей путем использования ПАА. Этот полимер действует как агент, связывающий коллоидные частицы ила с образованием больших хлопьев. Присутствие ПАА в активном иле затрудняет дальнейшую эффективную биологическую деградацию с

помощью анаэробных процессов на очистных сооружениях (Тере, 2015; Craciun, Manaila, Ighigeanu, 2019; Xie *et al.*, 2019).

Кроме того, эти полимеры также используются для синтеза красителей, пестицидов, клеящих веществ, косметики, текстиля, целлюлозно-бумажной продукции, пластмассовых изделий, взрывчатых веществ; в качестве химического тампонажного агента для затирки и стабилизатора грунта при строительстве туннелей, колодцев, резервуаров и плотин; в качестве поддерживающей среды для проведения гель-электрофореза белков и нуклеиновых кислот (Arvanitoyannis, Dionisopoulou, 2014; Тере, Çebi, 2019); в кондиционировании почвы (Xiong *et al.*, 2018; Radwan *et al.*, 2019) и др.

Вследствие широкого применения ПАА в различных промышленных процессах АА может выделяться в окружающую среду, повышая, тем самым, риск её загрязнения (Buranasilp, Charoenpanich, 2011; Gafar, Shukor, 2018). Так, АА обнаруживается в стоках предприятий в концентрации свыше 1 г/л (Kusnin, Syed, Ahmad, 2015).

ПАА обычно считается нетоксичным веществом для растений и животных, однако присутствие мономеров в его составе или их высвобождение при деградации полимера могут являться причиной загрязнения окружающей среды, а также нанести вред здоровью человека и животных (Joshi, Abed, 2017; Nyssölä, Ahlgren, 2019).

#### **1.1.1. Токсические эффекты акриламида**

АА – репротоксичное, генотоксичное и нейротоксичное соединение (Buranasilp, Charoenpanich, 2011; Quan *et al.*, 2011; Тере, 2015). Всемирная организация здравоохранения классифицировала его как канцероген группы 2А (потенциальный канцероген) (El-Assouli, 2009; Li *et al.*, 2014, Bedade, Dev, Singhal, 2019).

Токсические свойства АА были изучены экспериментально на лабораторных животных (Charoenpanich, 2013). Для изучения его воздействия на эукариотические организмы были использованы тесты на рецессивные летальные мутации,

сцепленные с полом и на соматические мутации, а также рекомбинации в *Drosophila melanogaster*; микроядерный тест в клетках костного мозга мыши, тесты на мутацию гена в клетках лимфомы мыши L5178Y; на хромосомные aberrации и обмены сестринских хроматид в клетках китайского хомячка V79 (Кнаар *et al.*, 1988). Было показано, что АА может индуцировать мутацию гена, полиплоидию или хромосомные аномалии соматических и зародышевых клеток млекопитающих (Tsuda *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2014).

Генотоксичность и канцерогенность может быть связана с его метаболитом – глицидамидом (ГА), который образуется в клетках млекопитающих в результате окисления цитохромом P450 2E1 (CYP2E1). Предполагают, что он обладает высоким мутагенным эффектом по сравнению с АА (Aras *et al.*, 2017).

Мутагенные и генотоксические эффекты ГА были подтверждены в различных исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Исследование на грызунах показало, что в результате метаболических реакций АА превращается в ГА, который индуцирует образование аддуктов с группами –SH, –OH и –NH<sub>2</sub> в ДНК, приводящих к мутагенезу и развитию рака. С другой стороны, метаболит может связываться с белками, такими как гемоглобин, альбумины плазмы крови, вызывая образование аддуктов. У людей ГА в результате гидролиза может перейти в менее реакционноспособное соединение – глицерамид (Besaratnia, Pfeifer, 2005; Duda-Chodak *et al.*, 2016).

Нейротоксическая активность АА связана с повреждением дистальных аксонов в центральной и периферической нервных системах, что может привести к повреждению коры головного мозга, таламуса и гиппокампа (Duda-Chodak *et al.*, 2016). Одним из возможных механизмов нейротоксичности является ингибирование передачи нейромедиаторов и аксонного транспорта на основе белков кинезинов. Такое воздействие может вызвать паралич задних конечностей и нарушение ходьбы у животных (Pundir, Yadav, Chhillar, 2019).

Как АА, так и ГА могут быть конъюгированы с глутатионом в результате активности глутатион-S-трансфераз (таких как GSTM1, GSTT1 и GSTP1). Исследование на гепатоцитах крыс показало, что такая конъюгация с глутатионом

может привести к снижению доступности этого соединения (Spencer, Wahome, Haasch, 2018).

Таким образом, снижение его концентрации в восстановленной форме после сопряжения с АА и накопление избыточного количества активных форм кислорода может инициировать окислительный стресс в клетках/организме (Duda-Chodak *et al.*, 2016).

Воздействие АА на человека и животных приводит к его абсорбции при проглатывании, вдыхании и через кожу. Наиболее опасно вдыхание аэрозолей этого вещества. Поскольку он хорошо растворим в воде, то быстро всасывается и распределяется по нескольким жизненно важным органам, таким как тимус, печень, почки, мозг, сердце, а также может передаваться плоду через плаценту и гематоэнцефалический барьер (Norouzi *et al.*, 2018; Pundir, Yadav, Chhillar, 2019). В основном, АА удаляется с мочой в течение 24 часов, однако может оставаться дольше в коже (Duda-Chodak *et al.*, 2016).

В исследованиях на людях воздействие АА при вдыхании приводит к мышечной слабости, а также к онемению рук и ног, раздражению горла и носа. Прямой контакт этого соединения с кожей вызывает покраснение, раздражение и шелушение (Gafar *et al.*, 2017). Было установлено, что при непосредственном контакте с данным токсикантом у рабочих возникали парестезии, потеря равновесия, слабость мышц, головные боли. При приеме внутрь могут развиваться такие симптомы, как дезориентация, нарушения памяти, галлюцинации и тромбозная атаксия (Pundir, Yadav, Chhillar, 2019; Тере, Çebi, 2019).

Случаи отравления человека этим веществом были зарегистрированы из-за загрязненной канализационной воды. Первоначальными симптомами являлись кожная сыпь, судороги, потливость и шелушение кожи. Также отмечались головная боль, одышка, мышечная слабость (Тере, Çebi, 2019).

В настоящее время мало известно о токсическом воздействии АА на рыб (Spencer, Wahome, Haasch, 2018). В отличие от полимера, мономер представляет собой небольшую подвижную молекулу, которая может проникать через мембрану водных организмов при низких концентрациях. Низкая биоаккумуляция АА в

водных организмах обусловлена его высокой растворимостью (2150 г/л) и деградацией микроорганизмами. Он легко попадает в водные объекты и может накапливаться в них в высоких концентрациях (Bedade, Dev, Singhal, 2019).

Некоторые исследования по влиянию АА на водную экосистему показали, что для некоторых организмов, таких как креветки, дафнии, радужная форель, золотая рыбка, рыбки Данио-рерио, синежаберный солнечник, мидии, водоросли и др., он является токсичным веществом и даже может вызвать их гибель (Тере, 2015; Spencer, Wahome, Haasch, 2018).

У мышей, подвергшихся воздействию АА через питьевую воду при дозах 1,25–24 мг/кг в течение 4 недель, наблюдали снижение показателей рождаемости, а также уменьшение количества сперматозоидов, атрофию яичек, увеличение частоты гибели эмбрионов (Aras *et al.*, 2017).

При исследовании онкогенности в течение жизни крысам давали АА в питьевой воде в дозе 0–2 мг/кг для самцов и 0–3 мг/кг для самок соответственно. В результате у них демонстрировалось увеличение частоты опухолей во многих органах (легкие, мозг, печень, различные железы), особенно при более высоких дозах (Тере, 2015; Duda-Chodak *et al.*, 2016).

Лабораторные исследования на животных показали, что воздействие АА может вызвать рак, генетическое повреждение и неблагоприятные последствия для размножения и развития, однако репродуктивная токсичность не была доказана у человека (Gafar *et al.*, 2017; Тере, Çebi, 2019).

### **1.1.2. Деградация акриламида и полиакриламида**

Существует пять способов разложения АА: термическое, фотолитическое, химическое, механическое и биологическое.

Во многих процессах очистки воды АА не может полностью разрушиться, однако может уменьшиться его концентрация. Кислые или щелочные условия среды также могут способствовать гидролизу этого соединения. Полиэлектролиты используются вместе с окислителями, такими как хлор, хлорамины, озон,

перманганат и пероксиды, что приводит к разложению АА (Gafar *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Биодеградация является одним из основных и эффективных способов разрушения загрязняющих органических и неорганических веществ (Charoenpanich, 2013).

В водных системах полная деградация АА, вероятно, происходит в течение 2 недель в аэробных и анаэробных условиях. Аэробная биодеградация по сравнению с анаэробной – основной путь разложения. Однако было установлено, что мономер может оставаться стабильным в течение 2 месяцев в водопроводной воде (Gafar, Shukor, 2018). Также было показано, что в поверхностной и технологической воде он полностью разрушался в течение 4–10 и 0,5 дней соответственно. Время, необходимое для его полного биоразложения, может варьироваться от 480 до 1100 ч в зависимости от типа пробы воды. Это объясняется тем, что некоторые виды организмов в воде могут взаимодействовать с данным соединением, ускоряя либо затрудняя его деградацию. Оптимальными параметрами для биодеградации АА в воде являются рН 6–8 и температура 15–30°C (Тере, Çebi, 2019).

Биодеградация в почве зависит от её типа и рН. Например, в песчаных почвах она имеет более низкую скорость, чем в глинистых. Поэтому АА может стать причиной загрязнения грунтовых вод. Его деградация максимальна при рН 7, однако она медленная при рН 8 и рН 6. Одним из наиболее важных механизмов удаления АА из почв является его гидролиз, катализируемый ферментами (Тере, 2015).

Несмотря на высокую токсичность АА для большинства микроорганизмов, некоторые могут использовать это соединение в качестве источника углерода и/или азота (Gafar, Shukor, 2018).

Сообщалось, что несколько родов, в том числе *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Moraxella*, *Ralstonia*, *Geobacillus*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, потенциально могут разлагать АА в окружающей среде (Jebasingh *et al.*, 2013; Lakshmikandan *et al.*, 2014; Jangkorn, Charoenpanich, Sriwiriyarat, 2018).

Некоторые грибы и дрожжи могут разлагать 60–80% АА. Например, *Phanerochaete chrysosporium* ВКМФ-1767, возбудитель белой гнили; нитчатые грибы, такие как *A. oryzae* KBN1010, *A. terreus* NRRL1960; дрожжи, такие как *Rhodotorula* sp. MBH23, *S. cerevisiae* (Joshi, Abed, 2017).

АА подвергается наиболее эффективной деградации бактериями, а не дрожжами. Среди разнообразия бактериальных штаммов существуют виды, которые встречаются в организме человека и могут участвовать в деградации АА при помощи амидаз, например, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *B. clausii*, *E. aerogenes* и *Helicobacter pylori*, но данных о том, что они непосредственно способны разрушать это токсическое соединение после его проглатывания в пищеварительном тракте, пока нет (Duda-Chodak *et al.*, 2016).

Несколько физико-химических факторов, таких как температура, pH, концентрация АА, природа среды и время роста микроорганизмов, могут влиять на эффективность биodeградации этого соединения (Bedade, Singhal, 2018).

Кроме того, существуют различные методы снижения содержания АА в пищевых продуктах. Например, удаление его предшественников, путем деградации аспарагина аспарагиназой. Активность фермента зависит от его количества, времени реакции, температуры и pH, при которых происходит реакция, но также сильно зависит от контакта с субстратом. Это означает, что в продуктах с низким уровнем влажности, ограниченная растворимость и подвижность субстрата и аспарагиназы приводит к неполному гидролизу аспарагина и уменьшению образования АА. Напротив, в продуктах с высоким содержанием воды, которая повышает подвижность предшественников, способность фермента к гидролизу снижается. Кроме того, бланширование продуктов может снижать образование АА. Было доказано, что этот процесс усиливает экстракцию предшественников из сырья. Бланширование вызывает также микроструктурные изменения в пище, которые облегчают контакт между аспарагином и аспарагиназой (Duda-Chodak *et al.*, 2016).

Деградация ПАА, происходящая как под влиянием физико-химических параметров среды, так и биологическая, вызывает особый практический интерес.

Поперечно-сшитые ПАА используются как влагоудерживающие агенты при выращивании сельскохозяйственных культур, цветоводстве и озеленении городских территорий (Смагин, Садовникова, Смагина, 2014; Максимова, Щетко, Максимов, 2023), в связи с чем возникает вопрос о дальнейшей судьбе полимера, а именно насколько часто и в каких количествах необходимо вносить полимер в почвы и грунты, а также не представляет ли внесение ПАА экологической опасности. Деградация ПАА и его производных, по-видимому, может происходить посредством механических, фотолитических, термических и химических процессов (Gilbert *et al.*, 2017). Согласно исследованию, было выявлено, что ПАА не деградирует до акриламидного мономера в присутствии солнечного света и глифосата. Напротив, глифосат, по-видимому, взаимодействует с мономером или полимером, снижая скорость разрушения (Charoenpanich, 2013).

Внесение линейно-сшитых ПАА в качестве флокулянтов при обработке сточных вод тоже требует исследований его дальнейшей деградации. Механическая деградация полимера в водных растворах включает в себя различные процессы, такие как перемешивание, прокачка, впрыскивание и др. В связи с этим изменение полимерного материала является необратимым.

Подобно механическому разрушению, фотодеградация (УФ-излучением) может приводить к необратимым изменениям как физических, так и химических свойств ПАА. Однако исследования были проведены только в лабораторных условиях, и выделение АА из обоих процессов все еще остается неопределенным и требует изучения (Тере, 2015; Тере, Çebi, 2019).

Полимеры с высокой молекулярной массой, такие как ПАА, не могут проходить через биологические мембраны. Следовательно, их биодегградация, скорее всего, инициируется внеклеточными амидазами либо в аэробных, либо в анаэробных условиях, и далее они частично или полностью разлагаются массивом различных ферментов (Caulfield *et al.*, 2003; Guezennec *et al.*, 2015; Gaytán, Burelo, Loza-Tavera, 2021). Немногие виды, принадлежащие к бактериальным родам *Enterobacter* spp., *Azomonas* spp., *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. и *Clostridium* spp., способны использовать ПАА и его производные в качестве

источника углерода и/или азота (Рогачева, Козулина, Кулакова, 2018; Joshi, Abed, 2017). Было показано, что из эукариотических организмов только гриб *Phanerochaete chrysosporium* использует ПАА в качестве источника углерода и азота. Известно, что грибы белой гнили разлагают многие загрязнители окружающей среды своими ферментами. Хотя амидазы участвуют в микробиологическом разложении ПАА, сведения о метаболических путях и ферментах реакции в настоящее время не ясны (Максимова, Горшкова, Демаков, 2017; Joshi, Abed, 2017; Nyysölä, Ahlgren, 2019).

Кроме этого, деградация полимеров может привести к выходу неполимеризованного АА, который, в свою очередь, может представлять угрозу загрязнения окружающей среды, а также нанести вред здоровью животных, в том числе человека (Bedade, Singhal, 2018).

Несмотря на различные способы разложения АА и ПАА биodeградация является эффективным, экономически выгодным и экологически безопасным подходом к ремедиации окружающей среды (Максимова, Овечкина, Максимов, 2021).

Таким образом, нет единого мнения о возможности биodeградации как поперечно-сшитых, так и линейных ПАА, не отработаны методики, позволяющие мониторировать этот процесс в окружающей среде и оценить роль бактерий в этом процессе.

## **1.2. Методы определения акриламида в окружающей среде и пище**

Все больше внимания уделяется анализу окружающей среды и продуктов питания, мониторингу промышленных процессов, а также обнаружению химического и биологического оружия (Michelini, Roda, 2012). Химический и физический анализ являются стандартными инструментами для мониторинга присутствия химических веществ в окружающей среде, например, при анализе питьевых, сточных и поверхностных вод (Lobsiger, Stark, 2019).

Большинство аналитических методов обнаружения и количественного определения АА нацелены на продукты питания (Куликовский и др., 2019; Wenzl,

De La Calle, Anklam, 2003; Tere, 2015). Также они применяются и для анализа водных образцов (Россинская и др., 2008; Кремко, Саракач, Докутович, 2012). Содержание АА 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).

Для оценки присутствия АА в воде и пищевых продуктах были разработаны такие аналитические методы, как газовая хроматография с масс-спектрометрией (ГХ–МС), газовая хроматография с tandemной масс-спектрометрией (ГХ–МС/МС), высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС), высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС/МС) (Kepekci Tekkeli, Önal C., Önal A., 2012; Pundir, Yadav, Chhillar, 2019; Pan *et al.*, 2020), жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ–МС/МС) (Rosén, Hellenäs, 2002) и жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий с масс-спектрометрией (Lobsiger, Stark, 2019; Tere, Çebi, 2019). Несмотря на то, что масс-спектрометрия обеспечивает высокую чувствительность и эффективность, эти методы являются дорогостоящими, трудоёмкими и требуют сверхчистых реактивов и стандартных веществ с мечеными атомами углерода  $^{13}\text{C}$ . Они также требуют подготовки образцов, которая включает экстракцию с использованием воды или метанола, стадии дериватизации (бромирование, силилирование, использование трифторуксусной кислоты, тиолов) и очистки, обычно состоящей из комбинации нескольких твердофазных экстракций или микроэкстракций, что занимает значительную часть процесса анализа (Demirhan *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2018; Norouzi *et al.*, 2018; Lobsiger, Stark, 2019). Наиболее высокочувствительными и селективными методами определения являются ВЭЖХ–МС и ГХ–МС (Batra, Pundir, 2016).

Наряду с хроматографическими методами определения АА существуют и другие. Например, метод дифференциальной импульсной полярографии (Кремко, Саракач, Докутович, 2011; Hu *et al.*, 2015); капиллярный электрофорез (Silva *et al.*, 2009); флуоресцентные методы с использованием квантовых точек (Hu *et al.*, 2014;

Liu *et al.*, 2014; Demirhan *et al.*, 2018); иммуноферментные анализы (Oracz, Nebesny, Zyzelewicz, 2011; Zhu *et al.*, 2016).

Хотя представленные методы являются высокочувствительными, селективными, стабильными, все же они имеют некоторые недостатки, такие как длительная подготовка образцов, потребность в дорогостоящем оборудовании и реагентах, обучение персонала работе с приборами, высокая стоимость анализа, невозможность анализа в режиме онлайн (Pundir, Yadav, Chhillar, 2019). Эти ограничения стимулировали разработку альтернативных методов, таких как использование биосенсоров, поскольку они являются простыми, чувствительными, специфичными и позволяют быстро провести анализ (Huang *et al.*, 2016).

### **1.2.1. Биосенсоры на определение акриламида**

Биосенсоры представляют собой аналитические устройства, которые включают в себя биологические материалы, такие как ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты, клетки микроорганизмов, ДНК и др. (Плотникова, Шумкова, Шумков, 2016; Решетилов, Плеханова, 2018; Pundir, Yadav, Chhillar, 2019), реагирующие на присутствие определенных молекул и выдающие информацию в виде электрического сигнала, пропорционального концентрации определенного химического соединения или ряда соединений (Michelini, Roda, 2012; Pan *et al.*, 2020).

Любой биосенсор состоит из двух принципиальных функциональных элементов: биоселектирующей мембраны, использующей различные биологические структуры, и физического преобразователя сигнала (трансдюсера), трансформирующего концентрационный сигнал в электрический (Asal *et al.*, 2019; Lobsiger, Stark, 2019).

Для считывания и записи информации используют электронные системы усиления и регистрации сигнала. Трансдюсерами могут быть электрохимические преобразователи (электроды), различного рода оптические, калориметрические, резонансные системы и т.п. (Варфоломеев, 1997; Shoaie *et al.*, 2019).

Благодаря их преимуществам, например, чувствительности, селективности, надежности, возможности повторного использования и легкой интеграции в портативные устройства, биодатчики являются отличным аналитическим инструментом (Fleming, 2004; Michelini, Roda, 2012; Rotariu *et al.*, 2016).

Особое внимание в течение последних нескольких лет уделяется применению нанобиотехнологических решений при создании биосенсоров. Углеродные нанотрубки, углеродные нановолокна, металлические или органические наночастицы используются в качестве компонентов конструкции электрохимических биосенсоров, в основном из-за их высокой электропроводности и большой площади поверхности. Такие биосенсоры более специфичны, чувствительны, стабильны и требуют меньше времени для проведения анализа (Сазыкина, Мирина, Сазыкин, 2015; Pan *et al.*, 2020).

Наибольшее распространение получили электрохимические биосенсоры. Одни из них генерируют разность потенциалов на специальном электроде, на поверхность которого нанесен слой биоматериала; другие генерируют электрический ток в результате реакции превращения определяемого вещества (аналита) на поверхности электрода (Ревин, Кадималиев, Атыкян, 2006).

Можно выделить два типа электрохимических биосенсоров на АА – амперометрические и потенциометрические (Batra, Pundir, 2016).

**Амперометрические биосенсоры.** Амперометрические биосенсоры измеряют генерируемый ток, когда электроны обмениваются прямо или косвенно между биологической системой и электродом и линейно зависят от количества анализируемого вещества. Измеряемый ток может быть непосредственно связан со скоростью электрохимической реакции, протекающей на индикаторном электроде (Биосенсоры: основы и приложения ... , 1992).

К амперометрическим биосенсорам на АА, не использующим наноматериалы, относятся: биосенсоры на основе пастообразного углеродного электрода, модифицированного с гемоглобином (Stobiecka, Radecka, Radecki, 2007); на основе золотого электрода, модифицированного одноцепочечной ДНК (Huang *et al.*, 2016), а также не содержащий метки электрохимический биосенсор

на основе ДНК, иммобилизованной на стеклообразном углеродном электроде, модифицированном оксидом графена (Li *et al.*, 2014).

К биосенсорам, использующим наноматериалы, можно отнести: биосенсоры на основе стеклянных углеродных электродов, модифицированных однослойными углеродными нанотрубками и гемоглобином (Krajewska, Radecki, Radecka, 2008), на основе ковалентной иммобилизации гемоглобина на нанокompозите из карбоксилированных многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ- $\text{COOH}$ ), наночастиц меди и полианилина, электроосажденных на электроде из графита (Batra *et al.*, 2013), на основе ковалентной иммобилизации наночастиц гемоглобина на поликристаллическом золотом электроде (Yadav, Chhillar, Pundir, 2018), а также на основе ковалентно иммобилизованного гемоглобина на нанокompозите, состоящем из МУНТ и наночастиц оксида железа, электроосажденных на золотом электроде через пленку хитозана (Batra, Lata, Pundir, 2013).

Принцип большинства таких биосенсоров основан на реакции гемоглобина с АА с образованием аддуктов на поверхности электрода при обратимой конверсии  $\text{Fe(II)/Fe(III)}$ . Увеличение их концентрации приводит к уменьшению тока, который можно рассматривать как аналитический сигнал, что является основой для селективного и чувствительного амперометрического биосенсора на АА (Batra, Pundir, 2016).

**Потенциометрические биосенсоры.** Они измеряют разность потенциалов (в вольтах), и ответ этих биосенсоров имеет логарифмическую связь с количеством продукта, образующегося из аналита. Такие биосенсоры могут состоять из разных типов электродов, например, ионоселективных, которые чувствительны к различным ионам в анализируемом растворе. Потенциометрические биосенсоры для определения АА состоят из ион-специфичного электрода, покрытого слоем иммобилизованных микроорганизмов. Метаболизм анализируемого вещества микроорганизмами вызывает изменение потенциала в результате накопления или истощения ионов. Разница между рабочим и контрольным электродами коррелирует с концентрацией анализируемого соединения (Сазыкина, Мирина, Сазыкин, 2015). Также эти биосенсоры могут быть основаны на электроде,

изготовленного как правило, из электрохимически инертного проводника (Pt, Au, Ag) (Биосенсоры: основы и приложения ... , 1992).

Такие биосенсоры основаны на прямом биохимическом взаимодействии между АА и интактными бактериальными клетками. Например, микробный биосенсор на основе ионоселективного электрода, специфичного к ионам аммония. Элементом биологического распознавания в этом случае являлись целые клетки *P. aeruginosa*, обладающие амидазной активностью (Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011).

Кроме этого, для контроля токсического действия АА на клетки феохромоцитомы был разработан биосенсор на электроде, модифицированном наночастицами золота и восстановленным оксидом графена (Sun *et al.*, 2013).

Перечисленные выше биосенсоры работали оптимально при pH 7,5–7,75 и диапазоне концентраций АА от 1 до 1950 мкМ. Предел обнаружения находился в диапазоне от 2 до 111 мкМ, а рабочее состояние наблюдалось в течение 40–95 дней (Batra, Pundir, 2016; Pundir, Yadav, Chhillar, 2019).

Основное отличие сенсорных технологий от традиционных подходов инструментального анализа состоит в том, что биосенсоры позволяют производить качественный и количественный анализ в реальном масштабе времени с минимальной дополнительной подготовкой анализируемого материала, так как в них процессы химического превращения определяемого вещества и измерения сигнала совмещены во времени и пространстве (Мамичев и др., 2012; Shoaie *et al.*, 2019).

Анализ научной литературы, посвященной разработке биосенсоров на АА, показал актуальность этой проблемы и наличие нерешенных задач. Так, многие предложенные биосенсоры отличаются дороговизной, сложностью технического исполнения, недолговечностью или использованием непростого в получении и эксплуатации биологического агента.

### 1.3. Иммобилизация клеток микроорганизмов в биосенсорах

Иммобилизованные бактериальные клетки широко используются в биокатализе, биодеструкции и биодетекции (Решетилов, Плеханова, 2018; Alvarez *et al.*, 2009).

Иммобилизация биологических объектов (прокариотических и эукариотических клеток, ферментов, макромолекул) – один из эффективных инструментов, используемых в биотехнологической промышленности, биохимии и молекулярной биологии, который изучался и совершенствовался с прошлого века. Иммуобилизация подразумевает различные способы прикрепления или захвата биокатализаторов, таких как ферменты, животные, растительные и микробные клетки или части клеток, делая их неподвижными или фиксированными (Giese *et al.*, 2020). Иммуобилизационные технологии часто увеличивают стабильность биокатализаторов и делают возможным их повторное использование (Eş, Vieira, Amaral, 2015), что, в свою очередь, снижает стоимость процесса. Поэтому большинство отраслей промышленности, применяющих методы зеленой химии, используют иммобилизованные клетки (Sjahrir *et al.*, 2016).

Микробные биосенсоры состоят из иммобилизованных клеток микроорганизмов как в жизнеспособной, так и нежизнеспособной форме. На сегодня наиболее актуально использование жизнеспособных целых клеток, так как живые клетки являются самоподдерживающейся системой; они метаболизируют всевозможные химические соединения, в результате чего образуются различные конечные продукты, такие как аммиак, диоксид углерода, кислоты и т.д., которые можно контролировать с помощью различных преобразователей сигнала (Сазыкина, Мирина, Сазыкин, 2015; Решетилов, 2015; Решетилов, Плеханова, 2018; Yoetz-Kopelman *et al.*, 2016) и при этом не требуется дорогостоящее и трудозатратное выделение ферментов (Asal *et al.*, 2019).

Было показано, что иммобилизация клеток позволяет повысить устойчивость к токсичным субстратам, стабилизировать их ферментативную активность,

продлить использование биокатализатора и увеличить выход конечного продукта по сравнению со свободными клетками (Martins *et al.*, 2013).

Основной трудностью работы с целыми иммобилизованными клетками в отличие от иммобилизованных ферментов являются наличие клеточной стенки, выступающей в роли добавочного диффузионного барьера. Одним из способов устранения этой проблемы является использование клеток с нарушенной проницаемостью мембраны.

Изменение проницаемости достигается физическими (замораживание и оттаивание), химическими (органические сольвенты/детергенты) и ферментативными (лизоцим, папаин) методами. Такая обработка приводит к появлению пор, тем самым позволяя свободно проникать низкомолекулярным веществам через клеточную мембрану, сохраняя большую часть высокомолекулярных соединений, таких как ферменты, внутри клетки. Это делает клетки нежизнеспособными, но они могут быть использованы в простых сенсорных системах, не требующих регенерации кофактора или метаболического дыхания (Биосенсоры: основы и приложения ..., 1992; Сазыкина, Мирина, Сазыкин, 2015).

Процесс иммобилизации включает в себя несколько этапов: от выбора материала носителя до метода с подходящими биокатализаторами.

Материал носителя должен обладать большой удельной поверхностью по отношению к клеткам, высокой механической прочностью и химической стабильностью, чтобы избежать возможного повреждения матрицы во время процесса. Идеальный носитель должен легко отделяться от реакционной среды, обеспечивать сохранение жизнеспособности клеток, не загрязнять окружающую среду и иметь низкую стоимость (Eş, Vieira, Amaral, 2015).

Для иммобилизации микроорганизмов используются различные поддерживающие материалы. Носители бывают органические и неорганические. Первые, в свою очередь, можно разделить на природные (целлюлоза, агар, агароза, хитозан, альгинаты, каррагинаны, белки и др.) и синтетические полимеры (ПАА, полиангидриды, полиуретаны, поливиниловый спирт и др.). К неорганическим

носителям относятся макропористые стекла, силикагели, глины, керамика, графит и др. (Ревин, Кадималиев, Атыкян, 2006; Плеханова, Решетилов, 2019; Гулий и др., 2020; Eleftheriou *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013; Murugan *et al.*, 2021).

Основные методы клеточной иммобилизации подразделяются на адсорбцию, ковалентную сшивку с носителями, включение в структуру гелей и инкапсуляцию (Michelini, Roda, 2012; Asal *et al.*, 2019). К необратимым методам относятся включение в структуру гелей (захват), ковалентное сшивание и инкапсуляция. Обратимым методом иммобилизации является адсорбция на материале носителя (Martins *et al.*, 2013; Asal *et al.*, 2019).

Существует несколько требований к методам иммобилизации клеток микроорганизмов в биосенсорах: надёжность, возможность связывания биологического компонента с сенсором через молекулы, которые проводят электроны, стабильность ферментативной активности.

Для обеспечения надёжности требуется: 1) высокая специфичность биологического компонента; 2) устойчивость системы к колебаниям температуры, ионной силы, pH, окислительно-восстановительного потенциала и химического состава окружающей среды; 3) встроенное приспособление, ограничивающее загрязнение или биологическую деградацию биокompонента (Биосенсоры: основы и приложения ..., 1992). Метод можно считать пригодным, если после присоединения к носителю биологические элементы сохраняют активность и стабильность.

Каждый из вышеперечисленных способов и носителей имеет свои преимущества и недостатки и может быть оптимизирован для конкретных биотехнологических целей.

Часто способ иммобилизации микробных клеток является критическим моментом в создании стабильно и длительно работающего биосенсора: клетки должны быть прочно закреплены на носителе (электроде), связанном с преобразователем сигнала, кроме того, не должна снижаться или ингибироваться необходимая для распознавания вещества ферментативная активность. Поэтому поиск и разработка предпочтительного для данного процесса метода

иммобилизации представляется особенно важным для осуществления биодетекции токсичного вещества в среде.

#### **1.4. Влияние акриламида на микроорганизмы**

Влияние АА на физиологию бактериальной клетки изучено достаточно слабо. Так, было показано, что АА оказывает ингибирующее действие на сульфгидрильные белки микроорганизмов из-за винильной группы в своем составе, что может приводить к токсическому эффекту и повлиять на рост бактерий (Bedade, Singhal, 2017). При этом нет сведений о воздействии АА на дыхательную активность, содержание внутриклеточного АТФ, жизнеспособность бактерий разных систематических групп.

Тем не менее, известно, что некоторые штаммы бактерий способны расти в присутствии АА и частично или полностью разрушать его (Joshi, Abed, 2017).

Мутагенное действие АА на высшие организмы является доказанным фактом, однако, сведения о его мутагенном действии на прокариоты противоречиво. Изучение мутагенного влияния АА на бактериальные клетки было основано на стандартном тесте Эймса с использованием различных индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA97, TA98, TA100 и TA102 с применением микросомальных фракций (Hashimoto, Tanii, 1985; Dearfield *et al.*, 1988; Кнаар *et al.*, 1988; Tsuda *et al.*, 1993; El-Assouli, 2009); тесте, основанном на мутациях устойчивости к стрептомицину с использованием *Klebsiella pneumoniae* (Кнаар *et al.*, 1988), а также тесте *E. coli* / микросомы. По результатам исследований было показано, что соединение не является мутагенным. Однако повреждение ДНК было выявлено на микробной тестовой системе, основанной на анализе генетического материала спор *B. subtilis* (англ. «spore-rec assay») (Tsuda *et al.*, 1993).

#### **1.5. Трансформация акриламида у микроорганизмов**

В последние годы значительное внимание уделяется микробной деградации АА (Максимова и др., 2018; Максимова, Овечкина, Максимов, 2021; Тере, 2015;

Jangkorn, Charoenpanich, Sriwiriyarat, 2018; Maksimova *et al.*, 2020). Он может разлагаться бактериями либо как источник углерода, либо как источник азота, или как источник углерода и азота по разным путям (Gafar *et al.*, 2017). Этот процесс регулируется действием фермента амидазы (акриламидамидогидролазы), которая катализирует гидролиз этого соединения до образования аммиака и акриловой кислоты (Wampler, Ensign, 2005; Tepe, 2015).

Амидазы (КФ 3.5.1.4) – ферменты, гидролизующие амиды карбоновых кислот до кислот и аммония (Павлова, Неустроева, Максимов, 2011; Sharma, Sharma, Bhalla, 2009). Амидазы классифицируют на две группы: алифатические амидазы, входящие в состав нитрилазной суперсемьи, и относящиеся к AS-семье. Это разделение основано на аминокислотных последовательностях и особенностях пространственной структуры.

Амидазы, относящиеся к нитрилазной суперсемье, содержат каталитическую триаду Glu, Cys, Lys и в растворе существуют в виде гомотетрамерных или гомогексамерных структур. Амидазы AS-семейства используют каталитическую триаду Ser, Ser и Lys и содержат очень консервативную последовательность в 130 аминокислот (AS-последовательность). В растворе амидазы AS-семейства существуют в виде гомодимеров или гомооктамеров (Дебабов, Яненко, 2011).

Как правило, амидазы являются сульфгидрилсодержащими белками и ингибируются тяжелыми металлами, такими как медь, никель, свинец и ртуть (Bedade, Singhal, 2017; Joshi, Abed, 2017).

Они устойчивы к денатурации при экстремальных значениях pH и температуры благодаря своей прочной и компактной структуре. Эти ферменты гидролизуют широкий спектр амидов и могут эффективно использоваться для дезактивации АА и других алифатических и ароматических амидов, загрязняющих окружающую среду (Sharma, Sharma, Bhalla, 2009). Многие авторы сообщают об амидазах, обладающих хорошей активностью в отношении ацетамида, хлорацетамида, мочевины и никотинамида, но очень низкой активностью в отношении АА (Bedade, Singhal, 2017).

В аэробных условиях после преобразования в акриловую кислоту и аммиак возможны два пути разложения АА, один из которых заключается в гидроксировании акриловой кислоты до  $\beta$ -гидроксипропионата и его окисления до диоксида углерода. Другой путь – восстановление  $\beta$ -гидроксипропионата до пропионата. Находясь в анаэробном состоянии, минерализация АА происходит посредством образования ацетил-КоА (Gafar *et al.*, 2017).

Амидазы широко распространены в природе и встречаются у бактерий, дрожжей, грибов, растений и животных (Bedade, Singhal, 2017). Механизм каталитической активности амидаз заключается в нуклеофильной атаке фермента на карбонильную группу амида, что приводит к образованию промежуточного тетраэдрического комплекса, который с отщеплением аммония превращается в промежуточный ацилферментный комплекс. Ацилферментный комплекс гидролизует до карбоновой кислоты и свободного фермента. Как и в случае нитрилаз, амидазы образуют ковалентную связь с субстратом. У амидаз нитрилазного семейства химическая связь формируется через остаток Cys, в амидазах AS-семейства – через остаток Ser.

Амидазы обладают и ацилтрансферазной активностью. Особенно эффективно ацильный остаток переносится на гидроксиламин. Гидроксамовые кислоты легко детектируются в присутствии хлорида железа, образуя ярко красный комплекс. Эта реакция часто используется для определения активности амидаз. Интересно, что амидазы могут обладать и нитрилазной активностью.

Так было показано, что высокоочищенная рекомбинантная амидаза из бактерий *R. rhodochlorus* J1, экспрессированная в *E. coli*, может гидролизовать бензонитрил до бензойной кислоты и аммония. Вместе с этим, гидролиз бензонитрила протекал в 6000 раз медленнее гидролиза бензамида. Замена Ser195 на Ala195 приводила к полной потере как амидазной, так и нитрилазной активности, что свидетельствует о том, что обе реакции протекают в одном и том же активном центре фермента. Амидазы проявляют достаточно высокую стереоспецифичность. Чаще всего гидролизу подвергается S-изомер амида. Амидазы, обладающие R-специфичностью, представляют значительный интерес

для синтеза исходных веществ для фарминдустрии и были найдены у бактерий *K. oxytoca* (Дебабов, Яненко, 2011).

Продукция амидаз обнаружена как у представителей бактерий родов *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Variovorax*, *Geobacillus*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, так и среди грибов родов *Aspergillus*, *Candida*, *Kluyvera*, *Kluyveromyces* (Silva *et al.*, 2009; Jebasingh *et al.*, 2013; Lakshmikandan *et al.*, 2014; Duda-Chodak *et al.*, 2016; Bedade, Singhal, 2018). Большинство изолированных акриламидодеградирующих бактерий принадлежало к родам *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Rhodococcus* (Joshi, Abed, 2017).

Например, амидаза (ациламид-амидогидролаза) из *P. aeruginosa* проявляет активность трансферазы и гидролазы с алифатическими амидными субстратами, такими как АА. Этот фермент катализирует перенос ацильных групп из амидов в гидроксилмин, образуя ацилгидроксаматы и аммиак, а также гидролиз алифатических амидов (например, АА), продуцируя соответствующую кислоту и аммиак (Silva *et al.*, 2009).

Помимо амидазного пути гидролиза АА, существует и нитрилгидратазно-амидазный. Нитрилгидратазный путь основан на гидролизе нитрилов (в частности, акрилонитрила) в соответствующие амиды (в частности, АА) с помощью фермента нитрилгидратазы. Последующее превращение амидов до кислоты и аммиака происходит с помощью фермента амидазы.

Процесс ферментативного синтеза АА включает стадию получения биокатализатора, обладающего высокой нитрилгидратазной активностью, и стадию биотрансформации нитрила в амид. Известно, что штаммы бактерий, относящиеся к родам *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* и *Bacillus*, способны к трансформации акрилонитрила в АА (Дебабов, Яненко, 2011). Одним из таких штаммов, обладающим высокой нитрилгидратазной активностью, является *R. ruber* gt 1 (Maksimov *et al.*, 2003).

Помимо нитрилгидратазного, вторым из двух основных путей гидролиза нитрилов является нитрилазный. Это прямой одностадийный гидролиз, осуществляемый ферментом нитрилазой с образованием соответствующей карбоновой кислоты и аммиака. Иногда может наблюдаться образование амида (таких как АА) в качестве побочного продукта. Одним из таких штаммов является *R. ruber* AKSH-84 (Дебабов, Яненко, 2011; Kamal *et al.*, 2011).

Использование селекционированных штаммов бактерий, обладающих высокой активностью таких ферментов, как нитрилгидратазы, амидазы и нитрилазы, является одним из приоритетных направлений биотехнологии для получения разнообразных амидов и карбоновых кислот из соответствующих нитрилов (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).

Помимо получения разнообразных соединений в результате ферментативного синтеза, амидазы и клетки микроорганизмов, обладающие высокой амидазной активностью, могут быть использованы в качестве биоселектирующего элемента биосенсора на АА. Ранее такой биосенсор был разработан на основе клеток *P. aeruginosa*, а детекция основывалась на ион-селективном электроде, который детектировал выделяющийся в реакции трансформации АА ион аммония (Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011).

Таким образом, микроорганизмы, обладающие амидазной активностью, широко изучаются. Однако сведений о влиянии АА на физиологию бактериальной клетки недостаточно, а данные о мутагенном влиянии АА на прокариотов противоречивы.

Экспресс-анализ АА в сточных водах и пищевых продуктах представляет большой практический интерес, в связи с чем является актуальной разработка биосенсора на это токсичное соединение. Также фундаментальный и практический интерес представляет проблема биodeградации полимеров и сополимеров АА, нет единого мнения о возможности использования бактериями полимера в качестве субстрата роста и источника необходимых элементов, в частности, нет

достаточного количества данных, позволяющих сделать вывод о биоразложении линейносшитого ПАА, используемого в качестве флокулянта в очистке сточных вод.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Бактериальные штаммы

Объектами исследования являлись штаммы *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *Rhodococcus erythropolis* 11-2, *Rhodococcus erythropolis* 6-21, *Rhodococcus ruber* gt 1, *Rhodococcus erythropolis* ИЛ БИО, *Alcaligenes faecalis* 2, обладающие амидазной активностью, *E. coli* K12, *E. coli* K12 TG1 (pXen7), индикаторные штаммы *S. typhimurium* TA1538 и *S. typhimurium* TA1535.

Амидазосодержащие штаммы были селекционированы и поддерживаются в лаборатории молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиала ПФИЦ УрО РАН. Штамм *E. coli* K12 TG1 (pXen7), содержащий полный lux-оперон *Photorhabdus luminescens* размером 7 тыс. п.н., был любезно предоставлен к.б.н. Масленниковой И.Л. (ПФИЦ УрО РАН, Россия). Штаммы *S. typhimurium* являются гистидинзависимыми ауксотрофами, сконструированные в лаборатории Эймса (Университет Калифорнии, Беркли, США) из исходного штамма *S. typhimurium* LT-2 дикого типа. *S. typhimurium* TA1538 содержит мутацию типа сдвига рамки считывания, а *S. typhimurium* TA1535 – мутация типа замены пар оснований (Ames, 1971; Ames, Lee, Durston, 1973; Ames, McCann, Yamasaki, 1975).

### 2.2. Среды, условия культивирования бактерий и определение ростовых характеристик

Для культивирования штаммов использовали среду LB следующего состава (г/л): триптон – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 5,0 и минимальную солевую среду следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 3,7; NaCl – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,005;  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,01; pH  $7,2 \pm 0,2$ . В качестве источника углерода для родококков использовали глюкозу в концентрации 0,1%, источником азота служили ацетонитрил в концентрации 0,05%, 10 мМ хлористый аммоний и 2,5 мМ ацетамид. Для штаммов *R. erythropolis*

ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 единственным источником углерода и азота был ацетамид в концентрации 0,1 М.

Культивирование проводили в 30 мл среды LB в конических колбах 100 мл и в 400 мл минеральной среды в конических колбах объемом 1000 мл в течение 5–7 сут на роторной качалке при постоянном перемешивании со скоростью 120 об./мин при температуре 22–25°C.

Биомассу концентрировали центрифугированием в течение 15–20 мин при 5000 g на центрифуге 5804 R («Eppendorf», Германия), отмывали однократно от среды культивирования стерильным 0,9%-ным хлоридом натрия, центрифугировали повторно, разводили в стерильном растворе хлорида натрия.

Рост культур оценивали по изменению оптической плотности (ОП) среды культивирования. ОП клеточной суспензии измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-3 (АООТ «ЗОМЗ», Россия) при  $\lambda = 540$  нм в 0,5 см кюветах в 3-кратной повторности.

Концентрацию клеток определяли гравиметрическим методом. Биомассу центрифугировали в пробирках типа Эппендорф объемом 1 мл в течение 10 мин при 10 000–14 000 g на центрифуге 5415 D («Eppendorf», Германия). После надосадочную жидкость сливали, а пробирки высушивали в термостате при 30°C в течение 3–7 сут до постоянного веса, после чего взвешивали пробирки с осадком клеток. Предварительно взвешивали пустые пробирки на аналитических весах, путем вычитания определяли массу сухих клеток для каждого штамма. Определение проводили в 3-кратной повторности.

### **2.3. Определение амидазной активности бактериальных штаммов**

Определение амидазной активности бактериальных штаммов основано на реакции трансформации АА в акриловую кислоту.

За единицу удельной ферментативной активности принимали скорость образования акриловой кислоты в ммоль, образуемой за 1 ч биомассой бактерий, соответствующей 1 г сухого веса. Единица амидазной активности соответствует 1 ммоль акриловой кислоты / г сухих клеток / ч.

Для определения активности фермента использовали раствор АА («Fluka», Швейцария) в концентрации 5, 10, 20, 40, 60, 100, 250 и 500 мМ. В пробирки типа Эппендорф добавляли 1 мл клеточных суспензий с разными концентрациями субстрата. Далее инкубировали на роторной качалке при постоянном перемешивании со скоростью 120 об./мин и температуре 30°C в течение 1 ч. По истечении времени реакцию трансформации АА останавливали 50 мкл концентрированной HCl и центрифугировали 10 мин при 10 000–14 000 g. Затем надосадочную жидкость переносили в новые пробирки, а концентрацию образовавшейся акриловой кислоты 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 5% ацетонитрил, скорость потока составляла 0,500 мл/мин при температуре 25°C, детекцию проводили при  $\lambda = 210$  нм.

Для предварительной оценки активности амидазы к 4 мл клеточных суспензий добавляли 100 мкл 1 М АА. Возрастание ОП оценивали на спектрофотометре («Ultraspec 3300», Англия) при  $\lambda = 230$  нм в течение 1 мин.

#### **2.4. Определение концентрации АТФ биолюминесцентным методом при воздействии акриламида**

Чтобы оценить влияние АА на содержание внутриклеточного АТФ, вносили АА до конечных концентраций 20, 50, 100 и 1000 мМ в лунки 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета («Медполимер», Россия), в которые предварительно раститровывали 100 мкл бактериальной суспензии. Контролем явилась суспензия без добавления АА. После 20-минутной экспозиции планшет центрифугировали 10 мин при 2464 g. Удаляли надосадочную жидкость. К осадку добавляли 100 мкл диметилсульфоксида для экстракции АТФ из клеток. Затем 100 мкл пробы замораживали и хранили при –18°C в пробирках типа Эппендорф.

Концентрацию АТФ определяли, используя стандартный набор реактивов АТР Bioluminescent Assay Kit («Sigma», США), в состав которого входит люцифераза светляков и люциферин (субстрат для фермента). Пробы разводили в

10 раз сверхчистой водой (СЧВ) в 96-луночном белом непрозрачном планшете и смешивали с разбавленным в 25 раз реагентом, содержащим люциферин и люциферазу. Исходный раствор АТФ разводили СЧВ в 50 раз, раститровывали и смешивали в равных пропорциях с люциферин-люциферазным реагентом.

Для определения концентрации АТФ в образце строили калибровочный график, используя результаты люминесценции контрольных образцов, содержащих известную концентрацию АТФ. Люминесценцию регистрировали на универсальном микропланшетном ридере Infinite M1000pro («Tecan», Швейцария).

## **2.5. 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. Для измерений в лунки добавляли 100 мкл суспензии *E. coli* K12 TG1 (pXen7) и 100 мкл растворов АА. В качестве отрицательного контроля использовали 100 мкл СЧВ. В качестве положительного контроля гашения свечения использовали раствор  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , содержащий 1 мг/л и 0,5 мг/л Zn.

Люминесценцию регистрировали на универсальном микропланшетном ридере Infinite M1000pro («Tecan», Швейцария) после 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 120 мин экспозиции с АА.

## **2.6. Определение выживаемости бактерий в присутствии акриламида**

В 5 мл среды LB, содержащей 10–1000 мМ раствор АА, вносили 100 мкл инокулята бактериальных культур. В качестве контроля вносили 100 мкл суспензии в 5 мл среды LB без АА. Определение проводили в 3-кратной повторности для каждого штамма бактерий. Штаммы культивировали в пенициллиновых флаконах 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).

## **2.7. Определение дыхательной активности бактериальных клеток при воздействии акриламида**

Определение проводили в 96-луночном плоскодонном прозрачном полистироловом планшете («Медполимер», Россия). Клеточные суспензии, предварительно разведенные в стерильном 0,9%-ном растворе хлорида натрия, засекали по 50 мкл в лунки, содержащие разные концентрации АА. Конечные концентрации АА составляли 10, 20, 50, 100, 250, 500 и 1000 мМ. В качестве контроля вносили 50 мкл суспензии в 50 мкл стерильного 0,9%-ого раствора хлорида натрия без АА. Для определения жизнеспособных клеток в присутствии АА использовали стандартный набор реактивов XTT Cell Proliferation Assay Kit («Roche», Германия), в состав которого входят реагент ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид) и реагент для активации (феназинметасульфат). Инкубацию клеток с добавлением 50 мкл активированного ХТТ-реагента проводили в течение 4 ч для родококков и 6 ч для алкалигенеса, измерения ОП проводили через 30 мин и далее каждый час. 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. Таким образом, интенсивность окрашивания среды в лунках пропорциональна количеству метаболически активных клеток.

## **2.8. Определение мутагенного действия акриламида на штаммы *Salmonella typhimurium***

Предварительно оценили выживаемость *S. typhimurium* в среде с АА. Культуру с чашки Петри переносили петлей в 30 мл LB и инкубировали без аэрации

24 ч при 37°C. В день эксперимента 1,5 мл ночной культуры вносили в 30 мл LB и выращивали 3–3,5 ч в термостате при 37°C. Затем культуру переносили в стерильные центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали 15–20 мин при 5000 g, осадок ресуспендировали в 20 мл солевого концентрата (3:1) и повторно центрифугировали при том же режиме. Полученный осадок ресуспендировали в 3 мл того же буфера. Пробирки с 2 мл предварительно расплавленной 0,7% агаризованной средой LB помещали в водяную термобаню TW-2.03 («ELMI», Латвия) с температурой 46°C. Культуру из 10-кратных разведений вносили по 100 мкл в пробирки, содержащие 100 мкл разных концентраций АА. Конечные концентрации АА составляли 0,25, 2,5, 25, 250 и 2500 мМ. Содержимое пробирки разливали на поверхность агаризованной среды ГРМ («ФБУН ГНЦ ПМБ», Россия). Чашки с двумя слоями агара выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего термостатировали при 37°C.

Определение проводили в 3-кратной повторности для каждого штамма бактерий. Жизнеспособность бактериальных штаммов на среде, содержащей АА, оценивали подсчетом КОЕ.

Мутагенную активность АА исследовали методом стандартного теста Эймса (полуколичественный метод).

Исследуемые (0,25, 2,5, 25, 250 и 2500 мМ) концентрации АА вносили в слой полужидкого агара (без метаболической активации). Культуру с чашки Петри переносили петлей в 30 мл LB и инкубировали без аэрации 24 ч при 37°C. В день эксперимента 3,5 мл ночной культуры вносили в 70 мл LB и выращивали 3–3,5 ч в термостате при 37°C. Затем культуру переносили в стерильные центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали 15–20 мин при 5000 g, осадки ресуспендировали в 20 мл солевого концентрата (3:1) и повторно центрифугировали при том же режиме. Полученные осадки ресуспендировали в 7 мл того же буфера. Пробирки с 2,5 мл предварительно расплавленного полуобогатщенного агара, следующего состава (г/л): агар – 6; биотин – 0,3; гистидин – 0,6, помещали в водяную термобаню TW-2.03 («ELMI», Латвия) с температурой 46°C. Культуру вносили по 250 мкл в пробирки, содержащие 100 мкл разных

концентраций АА. В качестве чистого контроля в пробирки с культурой вносили 100 мкл СЧВ без АА. В качестве позитивного контроля на штамме *S. typhimurium* TA1535 использовали нитрозометилмочевину (0,1 мл/чашку), а на штамме *S. typhimurium* TA1538 – 2,4-динитрофенилгидразин (0,1 мл/чашку). Содержимое пробирки разливали на поверхность минимального агара следующего состава (г/л): агар – 15;  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 10,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 4,5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1,0; глюкоза – 5,0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05; pH 7,2. Чашки с двумя слоями агара выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубировали 48–72 ч при 37°C. Наличие мутагенного эффекта регистрировали путем учета обратных мутаций у штаммов от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Определение проводили в 3-кратной повторности для каждого штамма бактерий.

## 2.9. 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 BS, обладающие катионной активностью; Праестол 2530 и Праестол 2540, обладающие анионной активностью; Праестол 2300 D, обладающий неионогенной активностью (Институт технической химии УрО РАН, Пермь). Клеточную суспензию вносили по 100 мкл в 25–30 мл среды с ПАА в трех вариантах: 1) в качестве единственного источника углерода и азота; 2) без дополнительного источника азота с глюкозой в концентрации 0,1% как источником углерода для *R. erythropolis* ИЛ БИО и ацетатом натрия в концентрации 1% для *A. faecalis* 2; 3) без дополнительного источника углерода с хлористым аммонием в концентрации 10мМ как источником азота. Культивирование проводили в конических колбах объемом 100 мл в течение 7–14 сут на роторной качалке со скоростью 110 об./мин при температуре 30°C. Рост бактерий оценивали по изменению ОП<sub>540</sub> клеточной суспензии, измеренной на фотоэлектроколориметре КФК-3 (АООТ «ЗОМЗ», Россия) в 0,5 см кюветах в 3-кратной повторности.

Динамический коэффициент вязкости среды измеряли в течение 2 мин при 100 rpm на ротационном вискозиметре ROTAVISC lo-vi Complete («IKA», Германия).

## **2.10. Иммобилизация бактериальных клеток методом включения в структуру геля**

### **2.10.1. Включение бактериальных клеток в структуру агарозного геля**

Раствор агарозы («LKB-Produkter AB», Швеция) в концентрации 4% нагревали до температуры кипения. После охлаждения до 40°C раствор агарозы смешивали в соотношении 3 : 1 раствор агарозы с суспензией клеток бактерий ( $OP_{540} = 1$ ). Затем 10 мл смеси помещали в чашку Петри. После застывания гель измельчали механически, размер гранул составлял 1–2 мм<sup>2</sup>.

### **2.10.2. Включение бактериальных клеток в структуру геля альгината бария**

Альгинат натрия («Fluka», Швейцария) растворяли в кипящей воде в концентрации 4% и автоклавировали при 121°C в течение 15 мин. После охлаждения до 40°C к раствору альгината натрия добавляли клеточную суспензию ( $OP_{540} = 1$ ) в соотношении 2 : 1 и тщательно перемешивали. Полученную смесь объемом 3 мл продавливали через шприц для подкожных инъекций в 10 мл холодного 0,1 М раствора BaCl<sub>2</sub>. Гранулы диаметром 2 мм ресуспендировали в свежем BaCl<sub>2</sub> в течение 24 ч при температуре 4–6°C. После гранулы отмывали дистиллированной водой.

Для приготовления геля альгината бария с многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) (Уральский научно-исследовательский институт композиционных материалов, г. Пермь, Россия) альгинат натрия растворяли в кипящей воде до концентрации 4%, автоклавировали при 121°C в течение 15 мин. После охлаждения раствора до 40°C иммобилизацию бактериальных клеток проводили двумя способами: 1) 50 мл альгината натрия смешивали с 10 мг МУНТ и затем добавляли 25 мл клеточной суспензии; 2) 10 мл клеточной суспензии

смешивали с 2 мг МУНТ, затем добавляли к 20 мл альгинату натрия. Далее иммобилизацию бактериальных клеток выполняли, как описано выше.

### **2.10.3. Включение бактериальных клеток в структуру геля к-каррагинана**

Растворенный в горячей воде к-каррагинан («Fluka», Швейцария) в концентрации 2% автоклавировали при 121°C в течение 15 мин. После охлаждения до 40°C к раствору к-каррагинана добавляли клеточную суспензию ( $ОП_{540} = 1$ ) в соотношении 2 : 1 и тщательно перемешивали. Полученную смесь сразу продавливали через шприц объемом 5 мл в 20 мл охлажденного до 4–6°C 0,1 М раствора KCl. Образовавшиеся гранулы оставляли для затвердения в растворе KCl в течение 20 мин. После гранулы отмывали дистиллированной водой.

### **2.11. Иммобилизация бактериальных клеток на неактивированном и активированном хитозане**

Раствор хитозана («Sigma-Aldrich», Япония) средней вязкости (2%) в 2%-ной уксусной кислоте нагревали до полного растворения и оставляли на несколько суток при комнатной температуре для удаления пузырьков воздуха из раствора. После накапывали раствор через шприц объемом 5 мл для подкожных инъекций в 20 мл 1 М раствора КОН. Гранулы оставляли на 1 ч в щелочном растворе для затвердения, затем отмывали большим количеством 0,1 М калий-фосфатного буфера ( $pH\ 7,2 \pm 0,2$ ) до нейтральной реакции промывных вод ( $pH\ 6,5–7,0$ ). Полученные гранулы использовали для адсорбции и ковалентной сшивки клеток. Для активации гранул добавляли 10 мл 0,1%-ого раствора глутарового альдегида и оставляли на 15 мин при комнатной температуре, после чего отмывали 20–30 мл дистиллированной воды. Гранулы хитозана смешивали с 10 мл бактериальной суспензии ( $ОП_{540} = 1$ ), перемешивали в течение 40 мин на роторной качалке со скоростью 120 об./мин при 30°C, отфильтровывали несвязавшиеся клетки через фильтр обеззоленный «белая лента» или «красная лента» (ООО «Бавер», Россия) и промывали иммобилизованный биокатализатор 20 мл дистиллированной воды.

Массу связавшихся с хитозаном клеток определяли по разности ОП растворов до и после контакта с носителем и вычисляли по формуле:

$$A = m \times V \times (D_{\text{исх}} - D_{\text{фильтр}}) / D_{\text{исх}}, \quad (1)$$

где  $A$  – масса связанных клеток, мг;

$m$  – концентрация клеток в суспензии до иммобилизации, мг/мл;

$V$  – объем суспензии, из которого иммобилизовали клетки, мл;

$D_{\text{исх}}$  – оптическая плотность клеточной суспензии до иммобилизации, при длине волны 540 нм;

$D_{\text{фильтр}}$  – оптическая плотность клеточной суспензии после иммобилизации.

## 2.12. Иммобилизация бактериальных клеток на терморасширенном графите

Иммобилизацию бактериальных клеток на терморасширенном графите (ТРГ) (ООО «Силур», Россия) проводили двумя способами: адгезией из выращенной культуры и выращиванием биопленок на поверхности материала. Для адсорбции к 0,5 г порошкообразного носителя (фракция 1,3 мм) добавляли 10 мл клеточной суспензии, перемешивали в течение 1 ч на роторной качалке со скоростью 120 об./мин при комнатной температуре. Далее отфильтровывали несвязавшиеся клетки через фильтр обеззоленный «белая лента» или «красная лента» (ООО «Бавер», Россия) и промывали иммобилизованный биокатализатор 0,1 М калий-фосфатным буфером (рН  $7,2 \pm 0,2$ ).

Навеску 0,5 г графита автоклавировали в конических колбах объемом 200 мл в 100 мл минеральной среды 1 ч и 121°C. Асептически добавляли 1,5 мл биомассы ( $ОП_{540} = 1$ ) в среду с графитом и соответствующие источники углерода и азота. Культивировали в течение 7 сут на роторной качалке со скоростью 120 об./мин при комнатной температуре. Выращенные биопленки отмывали однократно от среды культивирования 0,1 М калий-фосфатным буфером (рН  $7,2 \pm 0,2$ ) через фильтр обеззоленный «белая лента» или «красная лента» (ООО «Бавер», Россия).

### **2.13. Определение операционной стабильности иммобилизованного биокатализатора**

Операционную стабильность биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток оценивали по количеству акриловой кислоты (АК) при последовательном проведении полной конверсии 100 мМ раствора АА, вносимого в каждый цикл в реакционную среду. Время полного цикла составляло 24 ч. Реакцию проводили в 10–20 мл калий-фосфатного буфера, pH  $7,2 \pm 0,2$ , при 22–25°C, останавливали, добавляя в 1 мл пробы 50 мкл концентрированной HCl, центрифугировали 10 мин при 10000–14000 g и определяли концентрацию образовавшейся АК 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.

### **2.14. Определение электропроводности раствора с иммобилизованными биокатализаторами**

Электропроводность реакционной среды с биокатализаторами на основе иммобилизованных бактериальных амидазосодержащих клеток, включенных в структуру геля альгината бария и агарозы, оценивали по изменению проводимости раствора в результате трансформации 100 мМ АА в АК в 20 мл дистиллированной воды при 25°C. Измерение удельной электропроводности проводили 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. Зависимость электропроводности от концентрации АК определяли, раститровывая АК («Fluka», Швейцария) от 5 мМ до 95 мМ с шагом 5 мМ. В качестве контроля измеряли электропроводность 100 мМ АА с гранулами альгината бария и агарозы без клеток и иммобилизованных в структуре гелей альгината бария и агарозы бактериальных клеток без АА.

### **2.15. Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы Microsoft Excel 2019. Результаты представлены как среднее значение не менее чем трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ,  $n = 3$ ). Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента,  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Влияние акриламида на энергетический статус клеток бактерий родов *Rhodococcus* и *Alcaligenes*<sup>1</sup>

Энергетический статус бактериальных клеток оценивали по содержанию АТФ в клетках бактериальных штаммов *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. erythropolis* 6-21, *R. ruber* gt 1 и *A. faecalis* 2 при 20-минутной экспозиции с АА в концентрациях 20, 50, 100 и 1000 мМ. В клетках *R. ruber* gt 1 нами не было установлено достоверного отличия в концентрации АТФ после воздействия этого токсиканта и в контроле (Рисунок 1).

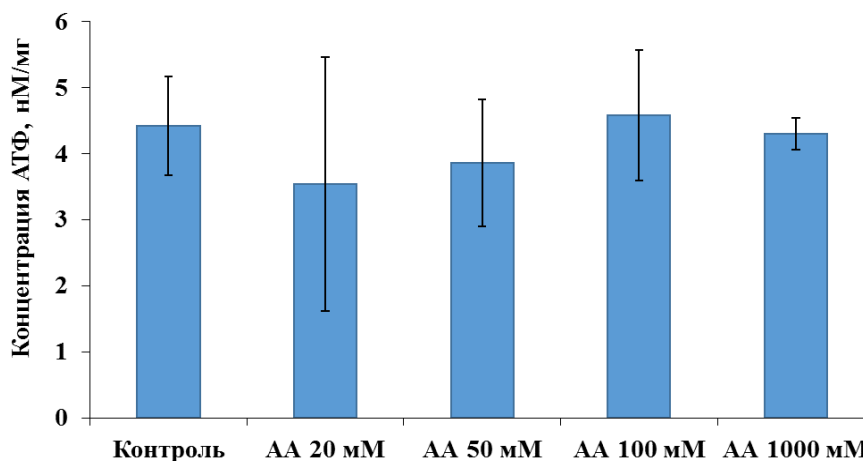


Рисунок 1 – Зависимость содержания АТФ в клетках *R. ruber* gt 1 от концентрации АА при 20-минутной экспозиции

При воздействии разных концентраций АА на клетки *A. faecalis* 2 было выявлено достоверное снижение концентрации АТФ при разных концентрациях субстрата по сравнению с контролем (Рисунок 2).

---

<sup>1</sup> Результаты опубликованы в работе: Максимова Ю.Г., Мочалова (Протасова) Е.М., Демаков В.А. Влияние акриламида на энергетическое состояние и выживаемость бактерий разных систематических групп // Докл. Рос. акад. наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 492. – С. 255–259.

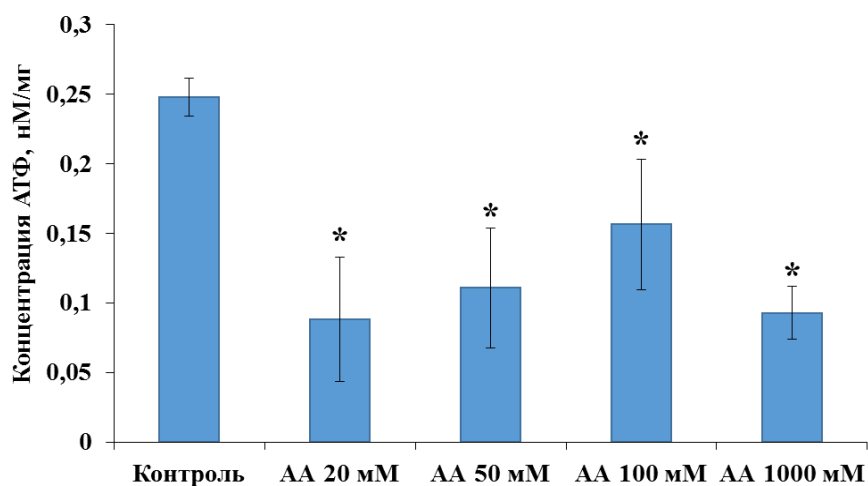


Рисунок 2 – Зависимость содержания АТФ в клетках *A. faecalis* 2 от концентрации АА при 20-минутной экспозиции (\* $p < 0,05$ )

В клетках *R. erythropolis* 4-1 наблюдается аналогичное предыдущему снижению концентрации АТФ в ответ на воздействие разных концентраций АА по сравнению с контролем, но оно не является достоверным (Рисунок 3).

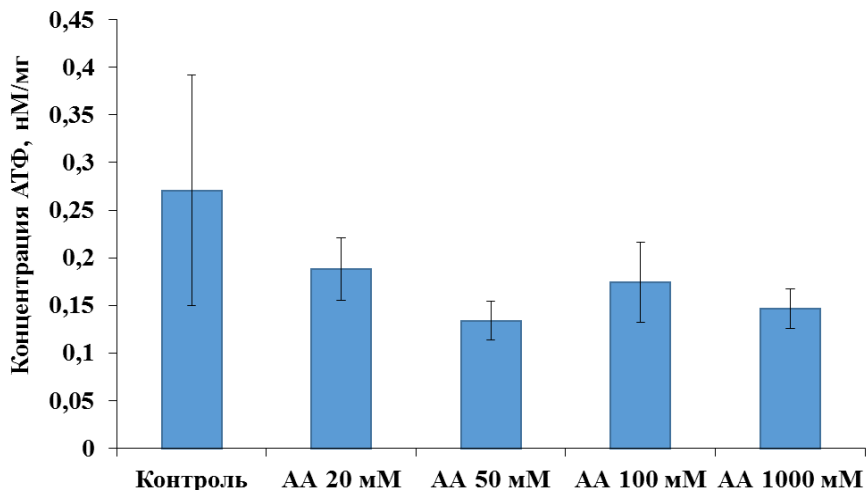


Рисунок 3 – Зависимость содержания АТФ в клетках *R. erythropolis* 4-1 от концентрации АА при 20-минутной экспозиции

У *R. erythropolis* 6-21 изменение концентрации АТФ в клетках при воздействии АА отображено на Рисунке 4. Было 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.

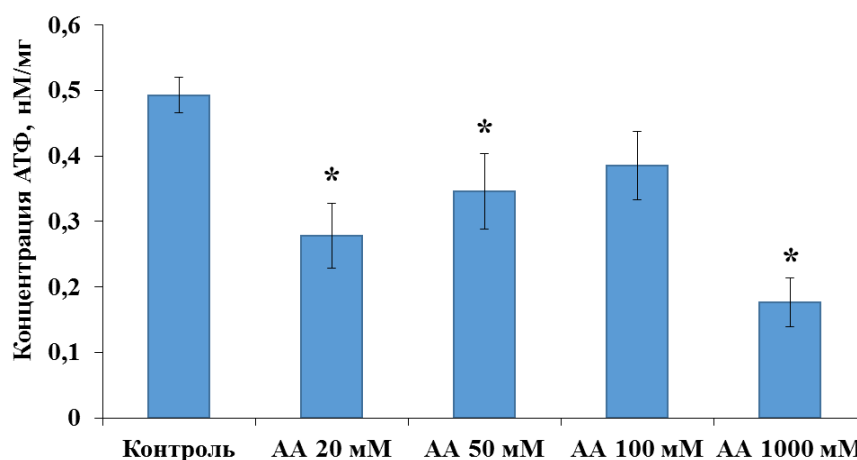


Рисунок 4 – Зависимость содержания АТФ в клетках *R. erythropolis* 6-21 от концентрации АА при 20-минутной экспозиции (\* $p < 0,05$ )

Изменение концентрации АТФ в клетках *R. erythropolis* 11-2 при воздействии АА отображено на Рисунке 5. Наблюдается снижение содержания внутриклеточного АТФ по сравнению с контролем, но оно является недостоверным.

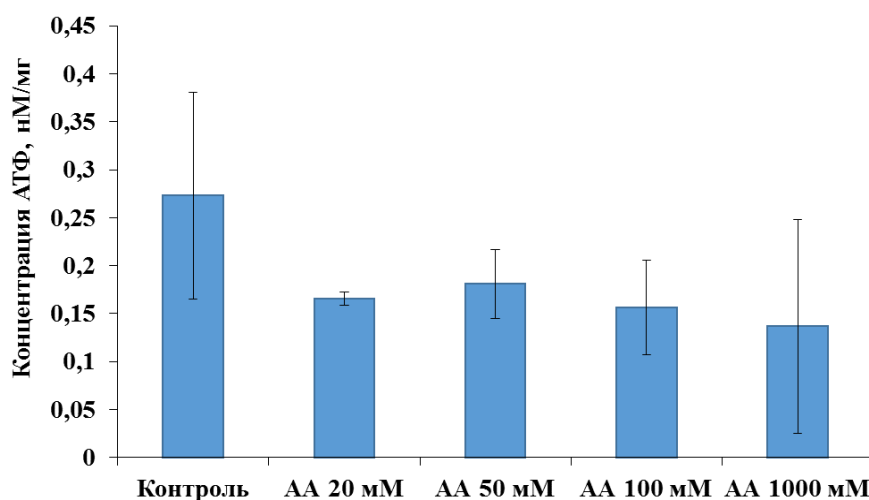


Рисунок 5 – Зависимость содержания АТФ в клетках *R. erythropolis* 11-2 от концентрации АА при 20-минутной экспозиции

Содержание внутриклеточного АТФ свидетельствует о метаболическом состоянии клетки. Методика, основанная на определении концентрации АТФ в клетках, предназначена для учета количества жизнеспособных клеток в образце, особенно когда затруднен прямой высев (Романова, Бровко, Угарова, 1997; Ефременко и др., 2005; Efremenko *et al.*, 2005). Однако корреляция между количеством жизнеспособных клеток и содержанием АТФ не всегда прямая, потому что стрессовое состояние микробной клетки может приводить как к снижению концентрации АТФ без потери жизнеспособности, так и к повышению при разобщении энергетического и конструктивного метаболизма. Полученные данные свидетельствуют о том, что 20-минутное воздействие даже 1 М раствора АА не приводит к полному ингибированию метаболизма. Отмечено, что самым устойчивым из изученных штаммов был *R. ruber* gt 1. Снижение концентрации внутриклеточной АТФ не наблюдали при воздействии АА в концентрации до 1 М. Это могло быть связано с тем, что данный штамм селекционирован в направлении повышения нитрилгидратазной активности, и при гидролизе высоких концентраций акрилонитрила клетки подвергаются действию продукта трансформации – АА.

### **3.2. Зависимость активности амидазы *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2 от концентрации акриламида**

Изучали влияние АА в диапазоне от 5 до 500 мМ на амидазную активность *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2. Выявлено, что при увеличении концентрации АА до 500 мМ наблюдается постепенное возрастание активности фермента штамма *R. erythropolis* 4-1. В этом диапазоне концентраций субстрата не происходило ингибирование ферментативной активности (Рисунок 6).

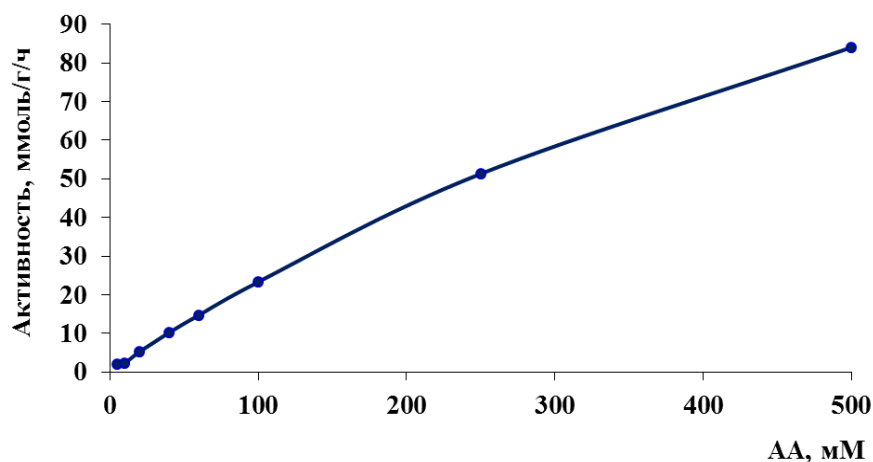


Рисунок 6 – Зависимость активности амидазы *R. erythropolis* 4-1 от концентрации АА

Если у родококка было отмечено постепенное возрастание активности амидазы, то у *A. faecalis* 2 до 100 мМ активность возрастает практически линейно, после чего она далее постепенно снижается, что, вероятно, связано с насыщением активных центров фермента субстратом. Зависимость активности амидазы данного штамма от концентрации АА показана на Рисунке 7.

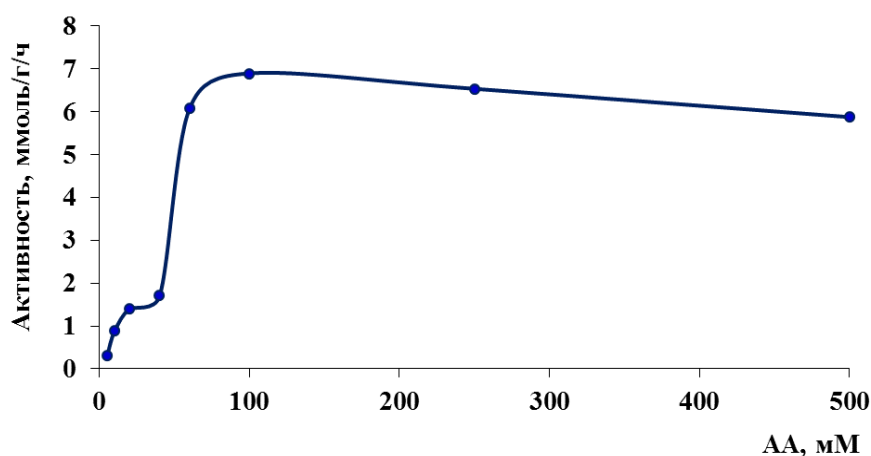


Рисунок 7 – Зависимость активности амидазы *A. faecalis* 2 от концентрации АА

Таким образом, высокие концентрации АА не приводят к ингибированию амидазной активности изученных бактерий. 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 АА из акрилонитрила (Maksimov *et al.*, 2003).

### 3.3. Влияние акриламида на биолюминесценцию *E. coli* K12 TG1 (pXen7)<sup>2</sup>

Было исследовано влияние времени воздействия и концентрации АА в диапазоне от 10 до 1500 мМ на свечение генно-модифицированного штамма *E. coli*, используемого в качестве сенсора на токсичные вещества. Показано, что при возрастании концентраций АА происходит снижение люминесценции при 0-, 10-, 20-, 30-, 40-, 50- и 120-минутной экспозиции. Зависимость гашения свечения *E. coli* K12 TG1 (pXen7) от концентрации АА при разном времени экспозиции показана на Рисунке 8. Также на Рисунке 9 представлен обобщенный график зависимости 50%-ного гашения люминесценции штамма от времени экспозиции с АА. Гашение на 50% наблюдалось при концентрациях 500, 350, 250, 210, 190, 150 и 100 мМ АА за 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 120 мин соответственно.

---

<sup>2</sup> Результаты опубликованы в работе: Максимова Ю.Г., Мочалова (Протасова) Е.М., Демаков В.А. Влияние акриламида на энергетическое состояние и выживаемость бактерий разных систематических групп // Докл. Рос. акад. наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 492. – С. 255–259.

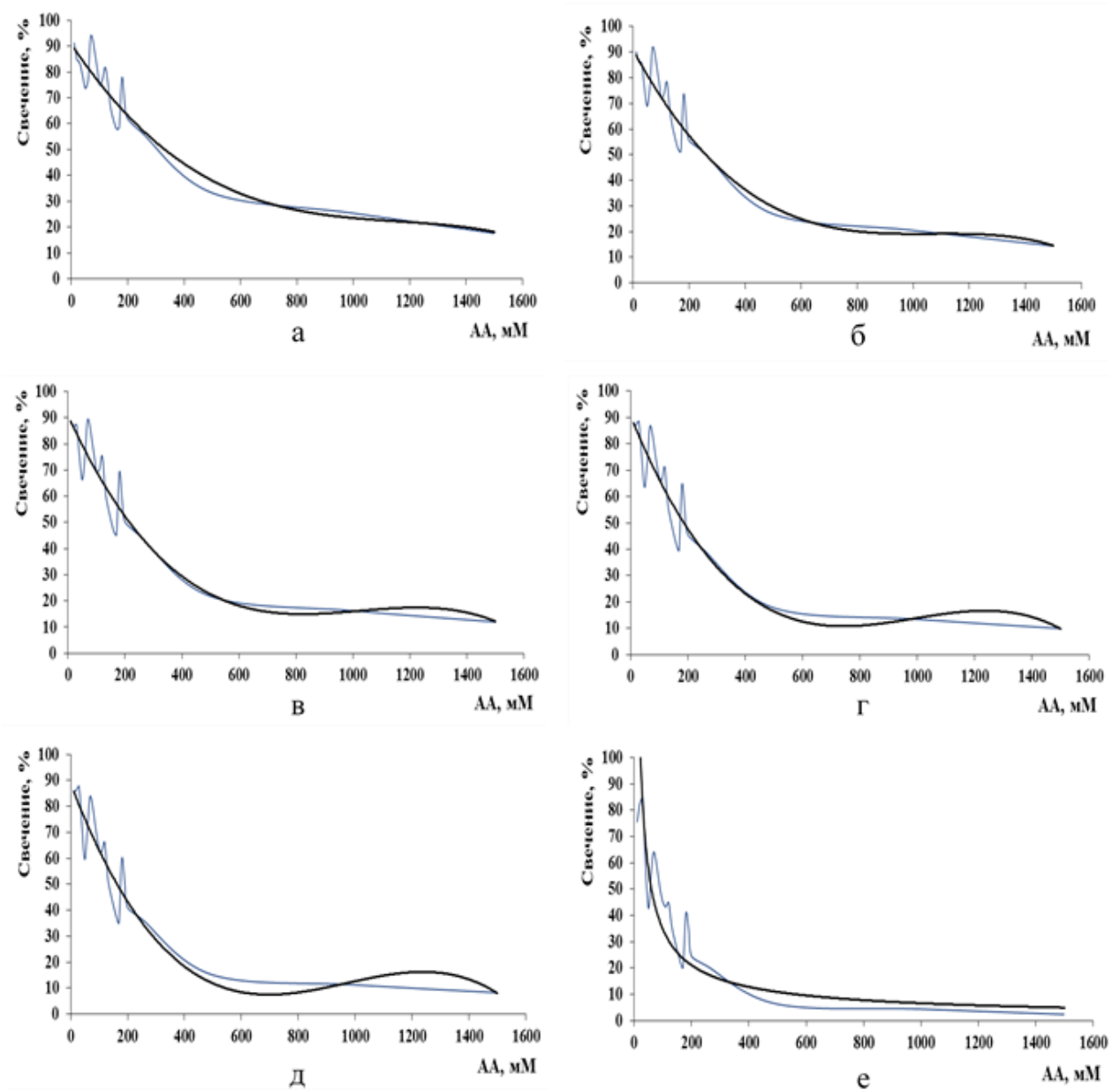


Рисунок 8 – Зависимость гашения свечения *E. coli* K12 TG1 (pXen7) от концентрации АА при 10- (а), 20- (б), 30- (в), 40- (г), 50- (д), 120-минутной (е) экспозиции. Свечение без воздействия (контроль) принято за 100%

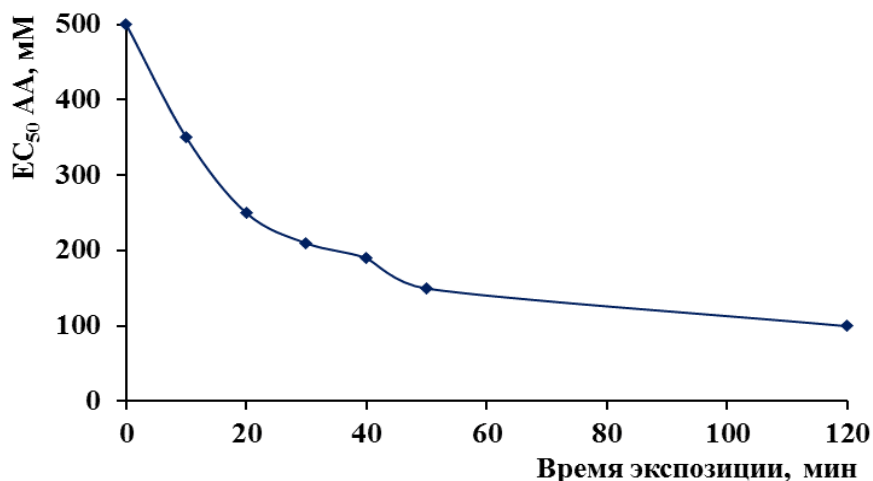


Рисунок 9 – Гашение свечения *E. coli* K12 TG1 (pXen7) на 50% ( $EC_{50}$ ) в зависимости от времени экспозиции с акриламидом

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  $EC_{50}$  для АА при 120-минутном воздействии составляла 7108 мг/л, тогда как к водным беспозвоночным  $EC_{50}$  АА составляет 98 мг/л при воздействии в течение 48 ч. Известно, что подобные сенсоры, основанные на гашении биолюминесценции, могут применяться для определения содержания различных экотоксикантов в среде (Данилов и др., 2002; Куц и др., 2011; Маслова и др., 2018; Шемшединова и др., 2020). Однако такой биосенсор является неспецифичным, так как люминесценция будет ингибироваться в присутствии различных органических поллютантов, тяжелых металлов и других веществ. Известно, что интенсивность люминесценции фотобактерий снижается при ингибировании люциферазы или сопряженных ферментативных систем на уровне ферментов или субстратов, при разрушении клеточной мембраны где локализована бактериальная люцифераза (Маслова и др., 2018), при нарушении дыхательной цепи, локализованной в цитоплазматической мембране, и, как следствие, при снижении в клетке концентрации восстановительных эквивалентов (НАДН, НАДФН). В присутствии других

веществ, нарушающих метаболизм клетки, невозможно качественно и количественно определить содержание АА. Полученные результаты дают основание сделать вывод, что токсичность АА для бактериальных клеток невысока. Так, например, при использовании для биотестирования штамма *Photobacterium phosphoreum* токсичность цинка, выраженная в  $EC_{50}$  (мг/л, 15 мин), составляет 1,0, фенола – 22,0, пестицида ДДТ – 7,0 (Куц и др., 2011), тогда как  $EC_{50}$  для АА при 15 мин воздействия составляет около 21300 мг/л.

### **3.4. Рост бактерий разных систематических групп на среде, содержащей акриламид<sup>3</sup>**

Способность к росту бактериальных штаммов *R. erythropolis* 6-21, *R. ruber* gt 1, *R. erythropolis* 11-2, *A. faecalis* 2, *E. coli* K12 и *E. coli* K12 TG1 (pXen7) в присутствии 10, 20, 50, 100, 250, 500 и 1000 мМ АА в питательной среде была оценена высевом на агаризованную питательную среду LB из серийных разведений и подсчетом КОЕ.

Результаты подсчета КОЕ исследуемых штаммов представлены в Таблице 1 и Таблице 2. Было выявлено отсутствие роста на полноценной питательной среде в присутствии АА в концентрации от 500 мМ и выше у большинства штаммов, кроме *R. erythropolis* 11-2. У большинства изученных штаммов АА в концентрации 10–20 мМ вызывает незначительное 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 приводит уже к снижению КОЕ на порядок. При содержании АА в среде, равном 250 ммоль/л, сохраняется от 0,016 до 0,116% жизнеспособных бактериальных клеток.

---

<sup>3</sup> Результаты опубликованы в работе: Максимова Ю.Г., Мочалова (Протасова) Е.М., Демаков В.А. Влияние акриламида на энергетическое состояние и выживаемость бактерий разных систематических групп // Докл. Рос. акад. наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 492. – С. 255–259.

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<br>(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                         |

Таким образом, бактерии родов *Escherichia* и *Alcaligenes* незначительно более чувствительны к присутствию АА в среде, чем бактерии рода *Rhodococcus*,

что может быть связано со строением клеточной стенки. Наиболее устойчивым к АА оказался *R. erythropolis* 11-2, который рос даже при 500 ммоль/л АА в среде.

### 3.5. Воздействие акриламида на дыхательную активность штаммов

#### *Rhodococcus* и *A. faecalis* 2<sup>4</sup>

Нами было исследовано пролонгированное влияние 10–1000 мМ растворов АА на дыхательную активность клеток штаммов *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. ruber* gt 1 и *A. faecalis* 2. Результаты отображены на Рисунке 10.

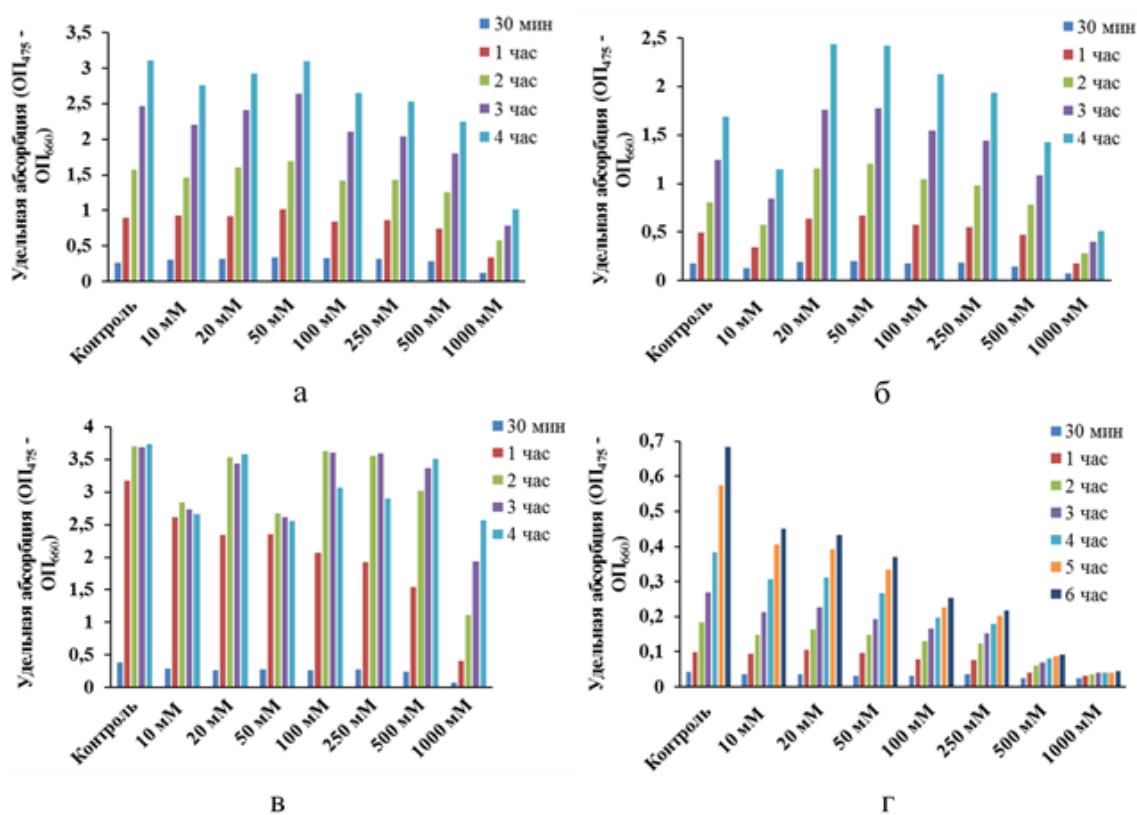


Рисунок 10 – Зависимость удельной абсорбции (ОП<sub>475</sub> – ОП<sub>600</sub>) суспензии *R. erythropolis* 4-1 (а), *R. erythropolis* 11-2 (б), *R. ruber* gt 1 (в), *A. faecalis* 2 (г) после

<sup>4</sup> Результаты опубликованы в работе: Мочалова (Протасова) Е.М., Максимова Ю.Г. Оценка генотоксичности акриламида и его влияния на жизнеспособность и метаболическую активность бактерий // Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования: сб. статей Всерос. науч. конф. с международным участием (Пермь, 18–20 окт. 2021 г.) / гл. ред. А. А. Елькин; отв. ред. М. Я. Лямин. – Пермь: ПГНИУ, 2021. – С. 76–79.

окраски реактивом ХТТ от времени воздействия и концентрации АА, отражающая дыхательную активность клеток

Показано, что при возрастании концентраций АА происходит снижение количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем у большинства штаммов. 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% дыхательной активности по сравнению с контролем, причем у наиболее устойчивого *R. ruber* gt 1 – 68,70%. Наименее устойчивый *A. faecalis* 2 сохранял к 6-му часу лишь 6,54% активности по сравнению с контролем. По результатам исследования было выяснено, что практически все изученные бактериальные штаммы устойчивы к АА. *A. faecalis* 2, являясь грамотрицательным микроорганизмом, проявил большую чувствительность, что обусловлено характерным строением клеточной стенки. Следует отметить сохранение метаболической активности клеток штаммов родококков в присутствии высоких концентраций АА. При этом наибольшая устойчивость *R. ruber* gt 1 связана с тем, что он является специально селекционированным штаммом и обладает высокой нитрилгидратазной активностью.

### 3.6. Определение мутагенного действия акриламида на штаммы *Salmonella typhimurium*<sup>5</sup>

Определили минимальные подавляющие и бактерицидные концентрации АА (0,25–2500 мМ) для индикаторных штаммов *S. typhimurium* TA1535 и TA1538.

---

<sup>5</sup> Результаты опубликованы в работе: Мочалова (Протасова) Е.М., Максимова Ю.Г. Оценка генотоксичности акриламида и его влияния на жизнеспособность и метаболическую активность бактерий // Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования: сб. статей Всерос. науч. конф. с международным участием (Пермь, 18–20 окт. 2021 г.) / гл. ред. А. А. Елькин; отв. ред. М. Я. Лямин. – Пермь: ПГНИУ, 2021. – С. 76–79.

Жизнеспособность оценивали в результате посева на агаризованную среду ГРМ с АА из серийных разведений при подсчете КОЕ.

Мутагенную активность АА исследовали полуколичественным методом 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.

При сравнении числа колоний-ревертантов на опытных и контрольных чашках отмечено отсутствие мутагенной активности АА (Таблица 3).

Таблица 3 – 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.

Выяснено, что АА не обладает выраженным бактерицидным действием по отношению к индикаторным штаммам сальмонеллы. Также АА не обладает генотоксичностью, а именно, не индуцирует ни мутаций типа сдвига рамки

считывания, характерные для штамма TA1538, ни мутаций замены пар оснований – для штамма TA1535.

В ранее выполненных исследованиях было показано отсутствие мутагенного действия АА на тестерные штаммы сальмонеллы, однако, работы были выполнены с метаболической активацией (Hashimoto, Tanii, 1985; Dearfield *et al.*, 1988; Кнаар *et al.*, 1988; Tsuda *et al.*, 1993). Метаболическая активация позволяет оценить мутагенное действие метаболитов исследуемого вещества с целью экстраполяции данных на высшие организмы. Однако целью настоящей работы было изучение прямого воздействия АА на бактериальные клетки, в том числе проявление генотоксических свойств АА по отношению к прокариотам.

При сравнении полученных результатов с данными научной литературы (Charoenpanich, 2013; Li *et al.*, 2014; Duda-Chodak *et al.*, 2016), касающимися воздействия АА, можно заключить, что это соединение слабо токсично для бактерий. Следовательно, его токсические свойства проявляются, главным образом, по отношению к эукариотам, главным образом к высшим многоклеточным организмам, а не к прокариотам. Бактериальные штаммы, обладающие амидазной активностью, устойчивы к АА и могут быть использованы в биотехнологиях, связанных с трансформацией этого вещества.

### **3.7. Культивирование бактерий *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 на среде с линейными полиакриламидами<sup>6</sup>**

Активное использование ПАА в очистке сточных вод требует решения задачи утилизации отработанных полимеров. Биodeградация является экономически эффективным и экологичным методом очистки окружающей среды от ксенобиотиков и органических поллютантов.

---

<sup>6</sup> Результаты опубликованы в работах: Протасова Е.М., Максимова Ю.Г. Биodeградация линейных полиакриламидов амидазосодержащими бактериями // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. трудов / науч. редкол. А. И. Зинченко [и др.]. – Минск: Из-во «Беларуская навука», 2023 – Т. 15. – С. 543–550; Протасова Е.М. Биodeградация линейных полиакриламидов амидазосодержащими бактериями // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. – 2025. – Вып. 1. – С. 43–48.

В работе были использованы амидазосодержащий штамм *R. erythropolis* ИЛ БИО, выделенный ранее из почвы в присутствии поперечно-сшитого ПАА и поддерживаемый в лаборатории молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН» – филиала ПФИЦ УрО РАН, и *A. faecalis* 2, выделенный ранее из активного ила очистных сооружений с 3-цианопиридином как единственным источником углерода и азота (Демаков и др., 2015).

Результаты культивирования бактерий в среде с линейным катионным ПАА 857 BS и анионным 2530 марок Праестол представлены в Таблице 4. Выявлено, что *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 могут использовать катионный ПАА в концентрации 0,05% как в качестве источника азота или углерода, так и единственного субстрата для роста биомассы. Наибольший рост бактерий наблюдали в среде с данным полимером как источником углерода с дополнительным источником азота, а также как единственным источником углерода и азота.

ОП<sub>540</sub> бактериальной суспензии в конце культивирования достигала 0,240 и 0,250 соответственно. Амидазосодержащие штаммы бактерий эффективнее использовали анионный ПАА в концентрации 0,05% и 0,01% в качестве источника азота с внесением дополнительного источника углерода – глюкозы или ацетата натрия. При этом ОП<sub>540</sub> в конце культивирования *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 не превышала 0,200 и 0,100 соответственно.

Таблица 4 – Рост бактерий *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 на среде с линейными ПАА 857 BS и 2530

| Тип ПАА                       | %    | Дополнительный источник С или N | ОП <sub>540</sub> в конце культивирования |
|-------------------------------|------|---------------------------------|-------------------------------------------|
| <i>R. erythropolis</i> ИЛ БИО |      |                                 |                                           |
| Катионный                     | 0,05 | N                               | 0,240                                     |
|                               |      | C                               | 0,130                                     |
|                               |      | –                               | 0,160                                     |
|                               | 0,01 | N                               | 0,030                                     |

|               |      |   |       |
|---------------|------|---|-------|
|               |      | C | 0     |
|               |      | — | 0     |
| Анионный      | 0,05 | N | 0     |
|               |      | C | 0,200 |
|               |      | — | 0     |
|               | 0,01 | N | 0     |
|               |      | C | 0,065 |
|               |      | — | 0     |
| A. faecalis 2 |      |   |       |
| Катионный     | 0,05 | N | 0,220 |
|               |      | C | 0,190 |
|               |      | — | 0,250 |
|               | 0,01 | N | 0,030 |
|               |      | C | 0     |
|               |      | — | 0     |
| Анионный      | 0,05 | N | 0,010 |
|               |      | C | 0,100 |
|               |      | — | 0,016 |
|               | 0,01 | N | 0,026 |
|               |      | C | 0,040 |
|               |      | — | 0     |

Примечание: ОП<sub>540</sub> в начале культивирования равно 0.

Результаты культивирования бактерий *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 в жидкой минеральной среде с линейным катионным ПАА 650 ВС, анионным 2540 и неионогенным 2300 D марок Праестол представлены в таблице 5. Выявлено, что *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 могут использовать ПАА катионный 650 ВС, анионный 2540 и неионогенный 2300 D в концентрации 0,1, 0,05 и 0,01% в качестве источника азота для роста биомассы. При этом наибольший рост бактерий наблюдали в среде с неионогенным полимером в концентрации 0,1%: ОП<sub>540</sub> в конце культивирования достигала 0,140 и 0,300 соответственно. 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 ВС 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 аминок групп, 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.

Отмечался слабый рост бактерий и образование небольших хлопьев в среде с данными полимерами как источниками углерода с введением в среду дополнительных источников азота, а также как единственными источниками углерода и азота.

Отсутствие роста *A. faecalis* 2 наблюдали в среде с анионным полимером в концентрации 0,1% в качестве единственного ростового субстрата и в концентрации 0,01% в качестве углеродного питания.

Таблица 5 – Рост бактерий *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 на среде с линейными ПАА 650 ВС, 2540 и 2300 D

| Тип ПАА                | % | Дополнительный источник С или N | В начале культивирования                 | В конце культивирования |                                          |
|------------------------|---|---------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|
|                        |   |                                 | Динамический коэффициент вязкости, мПа•с | ОП <sub>540</sub>       | Динамический коэффициент вязкости, мПа•с |
| R. erythropolis ИЛ БИО |   |                                 |                                          |                         |                                          |

|           |      |   |       |                           |       |
|-----------|------|---|-------|---------------------------|-------|
| Катионный | 0,1  | N | 6,50  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 6,90  |
|           |      | C | 6,40  | 0,125                     | 6,97  |
|           |      | — | 6,84  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 7,02  |
|           | 0,05 | N | 5,70  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 5,65  |
|           |      | C | 5,60  | 0,110                     | 5,38  |
|           |      | — | 5,48  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 5,46  |
|           | 0,01 | N | 3,80  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 4,02  |
|           |      | C | 4,02  | 0,070                     | 3,96  |
|           |      | — | 3,90  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 3,90  |
| Анионный  | 0,1  | N | 18,60 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 18,0  |
|           |      | C | 18,50 | 0,100                     | 18,10 |
|           |      | — | 22,0  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 18,90 |
|           | 0,05 | N | 7,68  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 7,32  |
|           |      | C | 7,40  | 0,030                     | 6,90  |
|           |      | — | 7,70  | 0,010                     | 7,63  |
|           | 0,01 | N | 4,30  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 4,37  |
|           |      | C | 4,50  | 0,015                     | 4,42  |
|           |      | — | 4,62  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 4,53  |

|              |      |   |      |                           |      |
|--------------|------|---|------|---------------------------|------|
| Неионогенный | 0,1  | N | 5,70 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 5,93 |
|              |      | C | 5,64 | 0,140                     | 5,77 |
|              |      | — | 5,60 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 5,89 |
|              | 0,05 | N | 4,74 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 4,64 |
|              |      | C | 4,80 | 0,092                     | 4,50 |
|              |      | — | 4,86 | 0,010                     | 4,70 |
|              | 0,01 | N | 3,84 | Слабый<br>рост            | 3,85 |
|              |      | C | 3,78 | 0,040                     | 3,66 |
|              |      | — | 3,80 | Слабый<br>рост            | 3,85 |

*A. faecalis 2*

|           |      |   |      |                           |      |
|-----------|------|---|------|---------------------------|------|
| Катионный | 0,1  | N | 6,42 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 6,44 |
|           |      | C | 6,36 | 0,140                     | 5,94 |
|           |      | — | 6,72 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 6,70 |
|           | 0,05 | N | 5,20 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 4,95 |
|           |      | C | 5,10 | 0,060                     | 4,70 |
|           |      | — | 5,15 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 4,80 |
|           | 0,01 | N | 3,63 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 3,50 |
|           |      | C | 3,85 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 3,75 |
|           |      | — | 3,90 | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 3,52 |

|              |      |   |       |                           |       |
|--------------|------|---|-------|---------------------------|-------|
| Анионный     | 0,1  | N | 18,70 | Слабый<br>рост            | 19,40 |
|              |      | C | 18,50 | 0,085                     | 18,30 |
|              |      | — | 22,0  | 0                         | 21,0  |
|              | 0,05 | N | 7,68  | 0,011                     | 7,48  |
|              |      | C | 7,40  | 0,060                     | 6,36  |
|              |      | — | 7,62  | 0,025                     | 6,74  |
|              | 0,01 | N | 4,30  | 0                         | 4,33  |
|              |      | C | 4,44  | Слабый<br>рост            | 4,20  |
|              |      | — | 4,60  | Слабый<br>рост            | 4,40  |
| Неионогенный | 0,1  | N | 5,60  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 5,63  |
|              |      | C | 5,40  | 0,300                     | 4,73  |
|              |      | — | 5,60  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 5,90  |
|              | 0,05 | N | 4,80  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 4,90  |
|              |      | C | 4,60  | 0,100                     | 4,25  |
|              |      | — | 4,86  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 4,90  |
|              | 0,01 | N | 3,84  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 3,80  |
|              |      | C | 3,72  | 0,025                     | 3,80  |
|              |      | — | 3,80  | Слабый<br>рост,<br>хлопья | 3,90  |

Примечание: ОП<sub>540</sub> в начале культивирования равно 0.

Таким образом, бактериальные штаммы *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2, обладающие амидазной активностью, могут использовать линейные ПАА в качестве субстрата для роста, возможно, способствуя их деградации. Показано, что

катионные и неионогенный ПАА подвержены более эффективной микробной деградации, чем анионные. По-видимому, это связано с отсутствием электростатического отталкивания между отрицательно заряженной клеточной стенкой и молекулой полимера.

### 3.8. Операционная стабильность иммобилизованных биокатализаторов *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2<sup>7</sup>

Многие биотехнологические процессы могут быть интенсифицированы путем иммобилизации микробных клеток, проявляющих определенную ферментативную активность (Ефременко, 2018; Martins *et al.*, 2013; Eş, Vieira, Amaral, 2015; Asal *et al.*, 2019). Для разработки прототипа биосенсора на АА необходимо провести скрининг различных методов иммобилизации клеток бактерий с амидазной активностью. Такой иммобилизованный биокатализатор должен обладать следующими качествами: он должен длительно сохранять ферментативную активность, необходимую для работы биоселектирующего агента, что позволит увеличить время его функционирования; ферментативная активность не должна ингибироваться в большом количестве циклов повторного использования; биоселектирующий агент должен сохранять стабильность при хранении; клетки должны быть прочно закреплены на носителе, не вымываться и не разрушаться. Были протестированы такие способы иммобилизации микробных клеток, как включение в структуру термотропных и ионотропных гелей, адгезия на нерастворимом носителе и выращивание биопленок.

Клетки *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2 были иммобилизованы с использованием таких органических носителей, как κ-каррагинан, агароза, альгинат бария и хитозан. Гели агарозы и κ-каррагинана относятся к

---

<sup>7</sup> Результаты опубликованы в работах: Мочалова (Протасова) Е.М., Максимова Ю.Г. Иммобилизация клеток нитрилгидролизующих бактерий *Rhodococcus erythropolis* 4-1 и *Alcaligenes faecalis* 2 с использованием термотропных и ионотропных гелей // Вест. Перм. ун-та. Сер.: Биол. – 2020. – Вып. 1. – С. 26–32; Protasova E.M., Maksimova Yu.G. Development of a bio-selecting agent based on immobilized bacterial cells with amidase activity for bio-detection of acrylamide // Appl. Biochem. Microbiol. – 2024. – V. 60, № 5. – P. 942–949.

термотропным, это означает, что золь-гель переход этих полимеров происходит при изменении температуры, альгината и хитозана – к ионотропным, у которых смена агрегатного состояния происходит при замене катиона в соли или изменении рН среды. На бактериальные клетки может оказывать неблагоприятное влияние повышенная температура, которая требуется для приготовления смеси геля с клетками, или определенные ионы могут быть токсичными для клеток. Полученные гели с включенными клетками могут обладать различной механической прочностью. Поэтому было необходимо протестировать и сравнить полученные иммобилизованные биокатализаторы в процессе многократного использования.

Выявлено, что 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. После проведения 1–3 циклов трансформации субстрата гранулы подверглись растворению в реакционной среде. Можно предположить, что это связано с физико-химическими характеристиками носителя или химической природой реакционной среды.

Показано, 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. Результаты показаны на Рисунках 11–14.

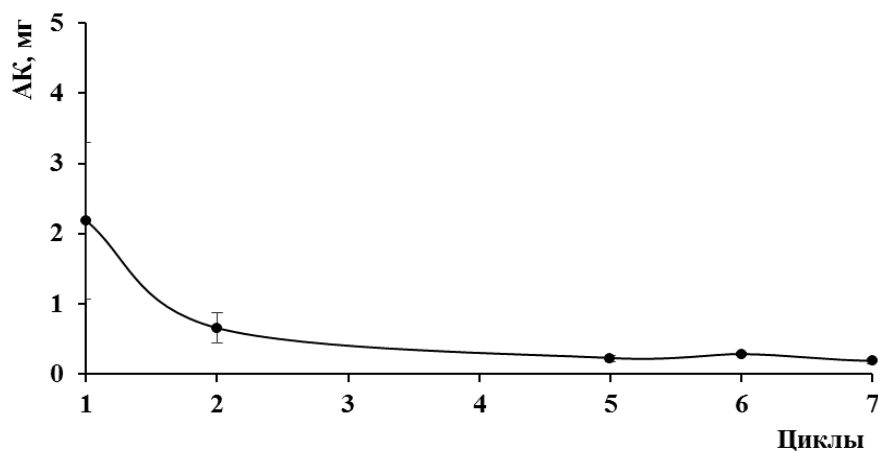


Рисунок 11 – Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *R. erythropolis* 4-1, иммобилизованных на активированном хитозане

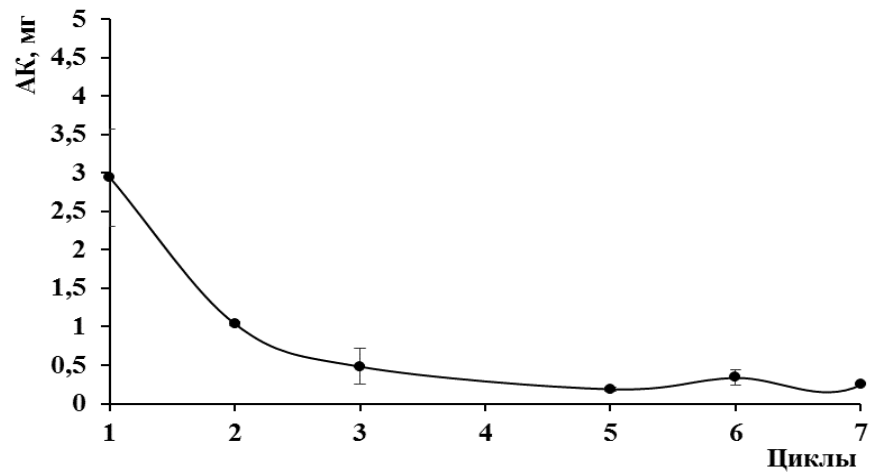


Рисунок 12 – Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *R. erythropolis* 4-1, иммобилизованных на неактивированном хитозане

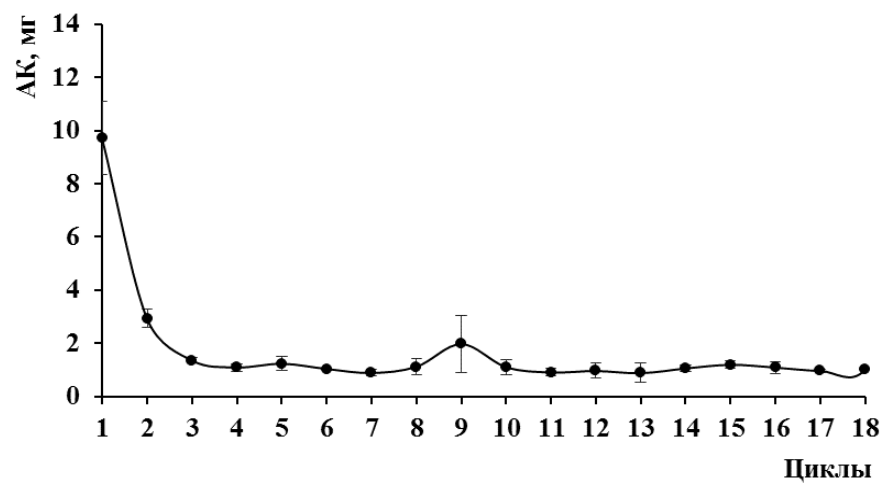


Рисунок 13 – Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *R. erythropolis* 4-1, включенных в структуру геля альгината бария

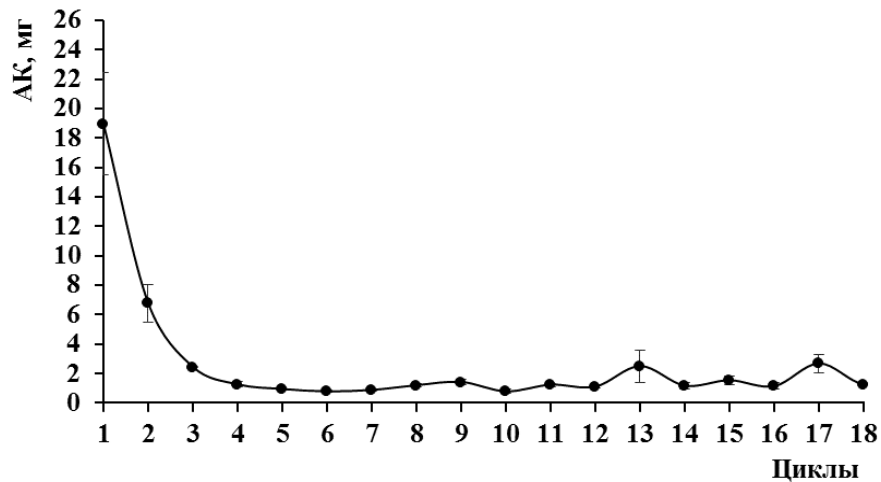


Рисунок 14 – Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *R. erythropolis* 4-1, включенных в структуру геля агарозы

Для штамма *R. erythropolis* 4-1 было выявлено, что использование агарозы в качестве носителя оказалось наилучшим по сравнению с другими типами матриц, так как не происходила потеря клеток в реакционной среде в результате повторного использования. Количество образующейся кислоты для биокатализаторов, иммобилизованных включением в структуру геля альгината бария и агарозы, составляет 1–2 мг на протяжении 18 циклов, а при использовании хитозана – 0,25–1 мг на протяжении 7 циклов.

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 включением в структуру к-каррагинана.

Выявлено, что наибольшее количество АК образовывалось при трансформации АА биокатализатором на основе альгината бария – 70–100 мг в отличие от биокатализатора, иммобилизованного в структуре агарозного геля (55–75 мг). Результаты показаны на Рисунках 15 и 16.

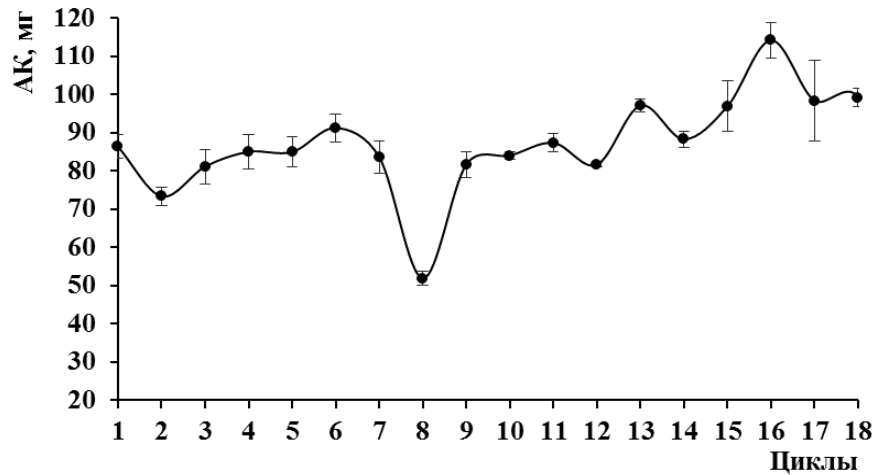


Рисунок 15 – Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру геля альгината бария

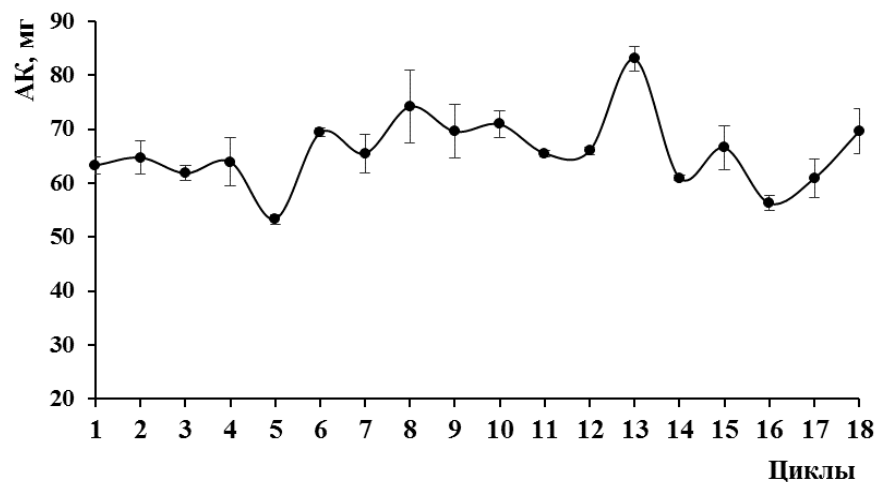


Рисунок 16 – Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру геля агарозы

Несмотря на наибольшее количество АК, синтезированное биокатализатором на основе альгината бария, использование этого геля не было предпочтительным. Гранулы геля со временем теряли механическую прочность и разрушались при проведении последовательных циклов трансформации АА, чего не наблюдали при использовании агарозы.

Снижение количества образованной кислоты наблюдали при трансформации АА биокатализатором на основе клеток *A. faecalis* 2, иммобилизованных на

активированном и неактивированном хитозане, что может быть связано с десорбцией клеток и их вымыванием из реакционной среды в результате многократного использования. Результаты показаны на Рисунках 17 и 18.

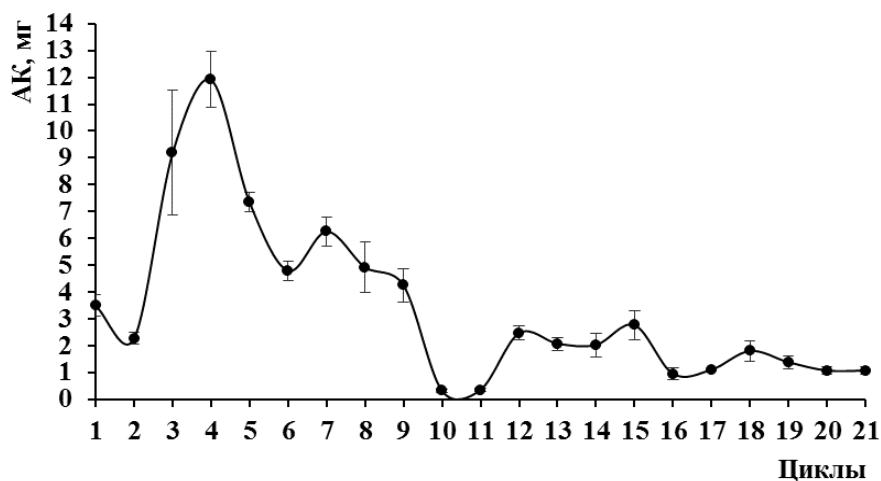


Рисунок 17 – Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *A. faecalis* 2, иммобилизованных на активированном хитозане

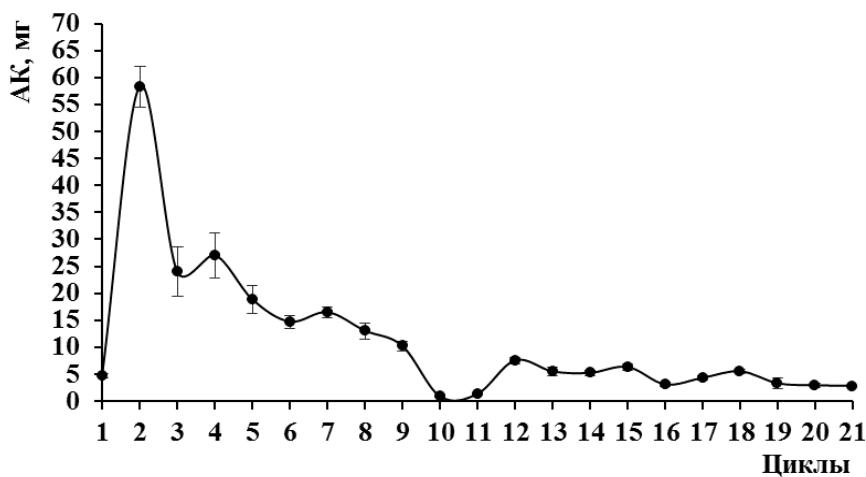


Рисунок 18 – Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *A. faecalis* 2, иммобилизованных на неактивированном хитозане

Чтобы повысить механическую прочность такой матрицы, как альгинат бария, применяемой для иммобилизации клеток, предложено использовать углеродные нанотрубки для создания «каркаса» в структуре геля. Установлено, что

после 20 циклов сохранялось 64% активности биокатализаторов *A. faecalis* 2 от проявляемой в первых циклах (Рисунок 19).

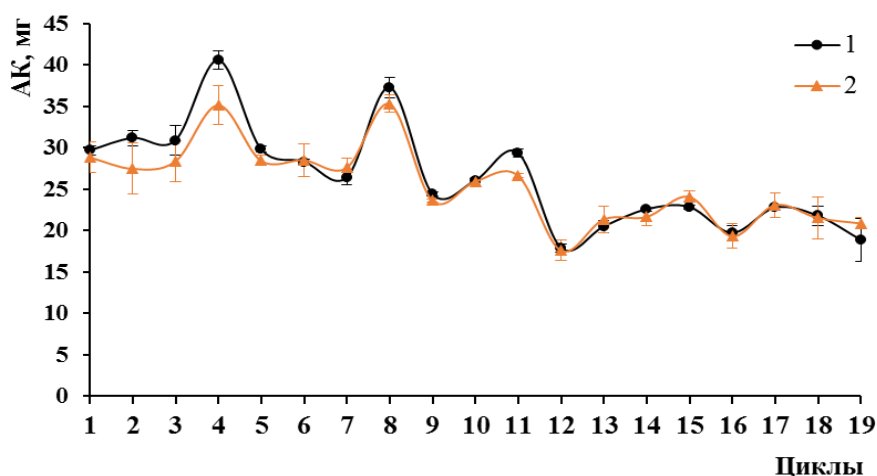


Рисунок 19 – Операционная стабильность биокатализаторов на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру геля альгината бария с МУНТ (1) и смешанных с МУНТ до иммобилизации в альгинате бария (2)

Выявлено, что 35–40 мг АК за 1 цикл образуется при трансформации АА биокатализатором, содержащим 0,9 мг клеток, приготовленным как способом 1, так и способом 2. Отмечено, что при длительной эксплуатации за счет увеличения механической прочности модифицированного носителя у такого биокатализатора появлялись преимущества перед бактериальными клетками, иммобилизованными в структуре немодифицированного альгината бария.

Таким образом, сравнение полученных иммобилизованных биокатализаторов по нескольким параметрам, а именно по общему количеству образованной кислоты, сохранению амидазной активности при долговременном использовании и механической прочности гранул, позволяет сделать выбор в пользу клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру геля агарозы. Однако использование альгината бария в качестве носителя также позволяет получить не менее стабильный биокатализатор, сохраняющий высокую амидазную активность на протяжении всех циклов трансформации 100 мМ АА.

При сравнении с данными научной литературы было показано, что включение клеток *P. fluorescens* C2, содержащих нитрилазу, в структуру геля агарозы позволяет получить стабильный биокатализатор, активность которого при трансформации акрилонитрила в АК не снижается в течение 30 циклов (Максимов, Максимова, Демаков, 2009). Известны другие примеры успешного использования амидазосодержащих клеток, иммобилизованных в структуре гелей, для долговременной многоциклового конверсии субстрата. Так, клетки *D. tsuruhatensis* ССТСС М 205114 в альгинате кальция в течение 8 последовательных циклов сохраняли 83,1% активности при энантиоселективном гидролизе (R)-2,2-диметилциклопропан карбоксамида (Wang *et al.*, 2010), а при иммобилизации клеток *R. rhodochrous* ННВ-2 в агаре и ПАА их амидазная активность увеличивалась в течение 5 циклов и оставалась затем неизменной в течение 10 циклов (Chand *et al.*, 2004).

Следовательно, несмотря на недостатки такого метода иммобилизации клеток (лимитирование процессов диффузии, непрочность геля, снижение ферментативной активности), включение клеток в структуру гелей может быть успешным для некоторых биокаталитических процессов и иммобилизации клеток в биоселектирующем элементе биосенсора.

### **3.9. Операционная стабильность биокатализаторов на основе клеток *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2, иммобилизованных на терморасширенном графите<sup>8</sup>**

ТРГ – это высокопористый материал, кристаллическая структура которого представляет собой термообработанный графит. Этот материал является перспективным для изготовления электродов, применяемых в различных целях, в том числе, в биосенсорах и микробных топливных элементах. Преимуществами

---

<sup>8</sup> Результаты опубликованы в работе: Protasova E.M., Maksimova Yu.G. Development of a bio-selecting agent based on immobilized bacterial cells with amidase activity for bio-detection of acrylamide // Appl. Biochem. Microbiol. – 2024. – V. 60, № 5. – P. 942–949.

ТРГ является высокая электропроводность, химическая стойкость, пластичность и возможность формирования электродов различных размеров и форм, в том числе электродов толщиной не более 0,1 мм (Глебова, Краснова, Нечитайлов, 2018; Китова, Колесов, Решетилов, 2018; Murugan *et al.*, 2021).

Клетки *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 были иммобилизованы на ТРГ двумя способами: адгезией из выращенной культуры и выращиванием биопленок на поверхности материала. 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. Амидазная активность адгезированных на ТРГ клеток бактерий сохранялась на протяжении 7-ми циклов (Рисунок 20). При этом наибольшее количество АК синтезировали родококки – 4–7 мг на 0,5 г биокатализатора, а наименьшее – *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.

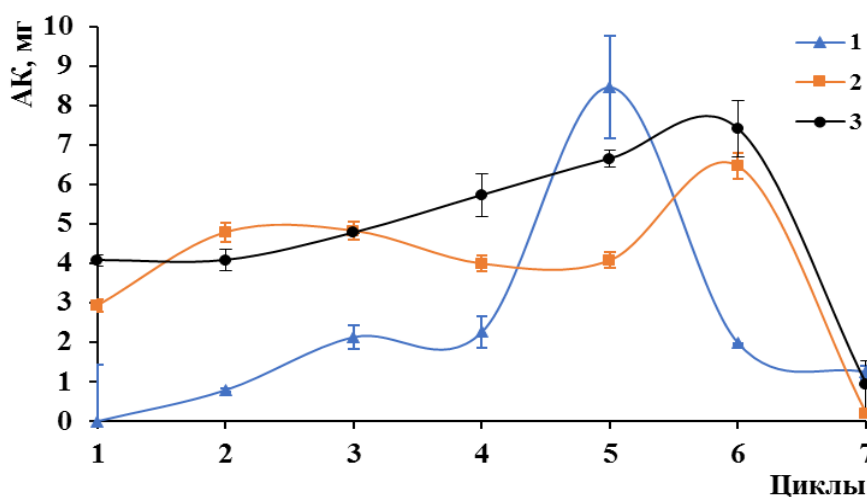


Рисунок 20 – Операционная стабильность биокатализаторов на основе клеток *A. faecalis* 2 (1), *R. erythropolis* 11-2 (2) и *R. erythropolis* 4-1 (3), адгезированных на ТРГ

Определено количество АК, образующейся при проведении последовательных циклов трансформации АА биокатализаторами на основе

биофленок *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2. Установлено, что 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. Показано, что наибольшее количество АК образовывалось при трансформации АА биокатализатором на основе биофленок *R. erythropolis* 11-2 на 0,5 г ТРГ – 100–120 мг, биокатализатором на основе *A. faecalis* 2 – 80–100 мг (Рисунок 21). При этом биофленки *R. erythropolis* 11-2 на ТРГ способны конвертировать АА в АК более чем в 20 циклах реакции с сохранением не менее чем 50% амидазной активности. Наименьшее количество кислоты (1–3 мг) продуцировали биофленки *R. erythropolis* 4-1.

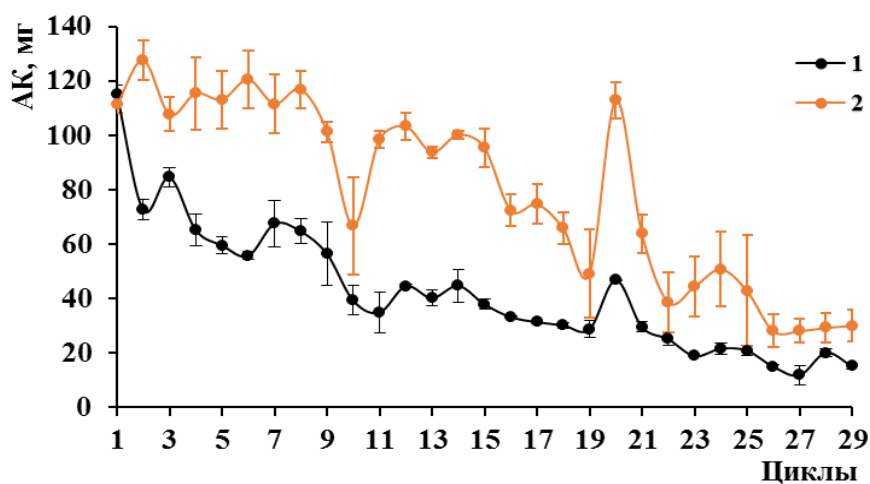


Рисунок 21 – Операционная стабильность биокатализатора биофленок *A. faecalis* 2 (1) и *R. erythropolis* 11-2 (2), выращенных на ТРГ

Таким образом, биофленки *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ могут применяться для различных биотехнологических целей, в том числе использоваться в качестве биоселектирующего агента биосенсора.

Ранее был разработан гетерогенный биокатализатор, гидролизующий амиды до соответствующих карбоновых кислот на основе адгезированных на углеродных адсорбентах клеток родококков, обладающих активностью амидазы (Максимова и др., 2015). Биофленки *A. faecalis* 2, выращенные на минеральных и углеродных волокнистых материалах, предложены для использования в биофильтрах для

очистки сточных вод, содержащих высокие концентрации АА (Максимова и др., 2018).

Адсорбция относится к простому и дешевому способу иммобилизации микробных клеток, однако для этого метода характерно постепенное вымывание клеток при многократном использовании. Адсорбция может быть применима тогда, когда нет необходимости в длительной эксплуатации иммобилизованного биокатализатора и слабого прикрепления клеток к материалу носителя достаточно для проведения процесса. Адгезированные клетки прочнее закрепляются на поверхности носителя, чему способствуют внеклеточные полимерные вещества, выделяемые клеткой. Для биодетекции необходимо прочное прикрепление клеток к электроду, и в этом случае для получения биоселектирующего агента перспективно включение бактериальных клеток в структуру гелей или выращивание биопленок на материале электрода. Так, биосенсоры на основе бактериальных биопленок ранее были разработаны для определения биологического потребления кислорода (Понаморева и др., 2011; Перчиков, Арляпов, 2023).

### **3.10. Операционная стабильность иммобилизованного амидазосодержащего биокатализатора после длительного хранения в различных условиях<sup>9</sup>**

Биоселектирующим агентом биосенсора на загрязняющие вещества могут быть иммобилизованные клетки микроорганизмов, обладающие соответствующей ферментативной активностью. Хранение биоселектирующего агента достаточно длительное время является необходимым для применения биосенсора. При этом важно, чтобы биоселектирующий агент не только долго функционировал и был способен к многократному использованию, но и длительно хранился без потери ферментативной активности.

---

<sup>9</sup> Результаты опубликованы в работе: Protasova E.M., Maksimova Yu.G. Development of a bio-selecting agent based on immobilized bacterial cells with amidase activity for bio-detection of acrylamide // Appl. Biochem. Microbiol. – 2024. – V. 60, № 5. – P. 942–949.

В процессе разработки прототипа биосенсора на АА были протестированы такие способы иммобилизации бактериальных клеток, как включение в структуру гелей, адгезия и получение биопленок на нерастворимом носителе. Ранее нами была изучена иммобилизация клеток амидазосодержащих бактерий *A. faecalis* 2 и *R. erythropolis* 4-1 с использованием термотропных и ионотропных гелей (Мочалова, Максимова, 2020). Показано, что клетки *A. faecalis* 2, включенные в структуру гелей агарозы и альгината бария, сохраняли амидазную активность в процессах гидролиза АА с образованием АК. Было установлено, что иммобилизованные на активированном и неактивированном хитозане клетки *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2 значительно теряли свою ферментативную активность по сравнению с нативными клетками (Максимова, Якимова, Максимов, 2019). На основании этого для проведения дальнейших экспериментов, касающихся сохранения ферментативной активности после хранения в различных условиях, в качестве матрицы для иммобилизации бактериальных клеток были выбраны гели агарозы и альгината бария.

Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру гелей агарозы и альгината бария, была определена 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 и при –80°C. После хранения определили амидазную активность биокатализатора и оценили возможность многократного использования. Результаты отображены в Таблице 6.

Таблица 6 – 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

| АК, мг/проба |         |         |       |       |
|--------------|---------|---------|-------|-------|
| Цикл         | 22–25°C |         | 4–6°C | –20°C |
|              | сухой   | влажный |       |       |
|              |         |         |       |       |

## Иммобилизованные клетки в структуре геля альгината бария

|   |                 |                  |                   |                    |                  |
|---|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| 1 | $0,32 \pm 0,13$ | $10,04 \pm 1,38$ | $12,55 \pm 1,53$  | $18,500 \pm 0,001$ | $18,23 \pm 0,08$ |
| 2 | $0,24 \pm 0,07$ | $8,63 \pm 0,10$  | $17,21 \pm 0,28$  | $19,80 \pm 0,34$   | $21,38 \pm 0,91$ |
| 3 | 0               | $8,76 \pm 0,78$  | $17,36 \pm 0,013$ | $18,0 \pm 0,45$    | $17,87 \pm 0,34$ |
| 4 | 0               | $6,91 \pm 0,07$  | $16,99 \pm 1,76$  | $14,96 \pm 0,37$   | $20,01 \pm 0,40$ |
| 5 | 0               | $5,43 \pm 0,65$  | $17,67 \pm 0,78$  | $16,42 \pm 0,53$   | $22,76 \pm 1,00$ |
| 6 | 0               | $5,64 \pm 0,04$  | $17,81 \pm 1,31$  | $16,40 \pm 0,42$   | $18,95 \pm 0,87$ |
| 7 | 0               | $6,88 \pm 0,87$  | $17,45 \pm 0,35$  | $13,99 \pm 0,80$   | $17,87 \pm 0,15$ |

## Иммобилизованные клетки в структуре геля агарозы

|   |                   |                 |                  |                  |                  |
|---|-------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 0                 | $2,38 \pm 0,37$ | $7,66 \pm 0,53$  | $7,26 \pm 0,11$  | $11,20 \pm 0,65$ |
| 2 | $0,07 \pm 0,01$   | $2,14 \pm 0,39$ | $9,41 \pm 0,86$  | $7,41 \pm 0,25$  | $14,41 \pm 1,39$ |
| 3 | 0                 | $1,93 \pm 0,05$ | $10,63 \pm 0,77$ | $10,14 \pm 0,51$ | $15,07 \pm 1,73$ |
| 4 | $0,070 \pm 0,001$ | $3,28 \pm 0,04$ | $8,65 \pm 0,35$  | $8,79 \pm 0,30$  | $10,91 \pm 0,36$ |
| 5 | 0                 | $1,99 \pm 0,12$ | $6,88 \pm 0,04$  | $7,34 \pm 0,48$  | $10,13 \pm 0,74$ |
| 6 | $0,063 \pm 0,003$ | $1,94 \pm 0,06$ | $7,74 \pm 0,45$  | $7,93 \pm 0,13$  | $12,18 \pm 1,16$ |
| 7 | 0                 | $2,27 \pm 0,68$ | $7,45 \pm 0,30$  | $6,12 \pm 0,31$  | $11,47 \pm 0,84$ |

Примечание: исходная амидазная активность неиммобилизованных клеток 0,6 мкмоль/мг/мин, амидазная активность сразу после иммобилизации в альгинате бария и агарозе 0,59 и 0,14 мкмоль/мг/мин соответственно. В одной пробе

содержалось 3 мг клеток, иммобилизованных в структуре альгината бария, или 9 мг, иммобилизованных в агарозе.

Амидазная активность высушенных биокатализаторов после хранения при комнатной температуре была ингибирована после второго цикла реакции. Установлено, что 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. Отмечено, что использование агарозы в качестве матрицы для иммобилизованных биокатализаторов было предпочтительным по сравнению с альгинатом бария.

### **3.11. Разработка прототипа кондуктометрического биосенсора на акриламид<sup>10</sup>**

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 изменяла электропроводность раствора, тогда как АА не обладал таким свойством. Зависимость электропроводности растворов от концентрации АК представлена на Рисунке 22.

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

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

---

<sup>10</sup> Результаты опубликованы в работе: Protasova E.M., Maksimova Yu.G. Development of a bio-selecting agent based on immobilized bacterial cells with amidase activity for bio-detection of acrylamide // Appl. Biochem. Microbiol. – 2024. – V. 60, № 5. – P. 942–949.

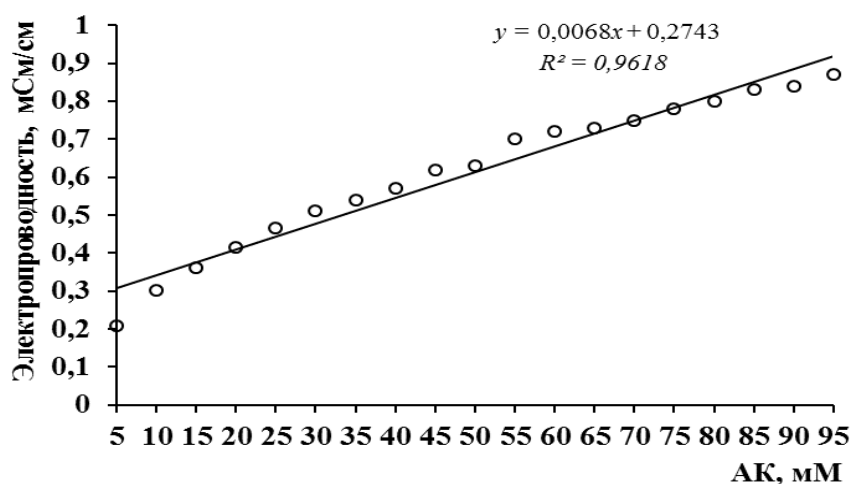


Рисунок 22 – Электропроводность растворов АК

Определена удельная электропроводность водного раствора после трансформации АА в АК. Показано, что наибольшая разница в электропроводности раствора (470 мкСм/см за 1 ч) получена при трансформации АА клетками *A. faecalis* 2, иммобилизованными в структуре геля агарозы (Таблица 7). Контролем являлись гранулы агарозы и альгината бария без бактериальных клеток с АА и иммобилизованные клетки без АА. Было установлено, что электропроводность раствора в последних двух вариантах не изменялась.

Таблица 7 – Удельная электропроводность (мкСм/см) водного раствора при трансформации АА иммобилизованными биокатализаторами

| Время,<br>мин | Удельная электропроводность, мкСм/см       |     |                                  |     |                                                   |    |                                                  |    |
|---------------|--------------------------------------------|-----|----------------------------------|-----|---------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------|----|
|               | <i>A. faecalis</i> 2,<br>альгинат<br>бария |     | <i>A. faecalis</i> 2,<br>агароза |     | <i>R. erythropolis</i><br>11-2, альгинат<br>бария |    | <i>R. erythropolis</i><br>4-1, альгинат<br>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 |

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.

Иммобилизованные бактериальные клетки с амидазной активностью могут служить основой биоселектирующего агента при разработке прототипа кондуктометрического биосенсора. Такой анализатор, как кондуктометр, может быть использован для качественного определения АА в жидкостях, так как он отличается простотой исполнения и незначительными затратами на изготовление и эксплуатацию.

Таким образом, биоселектирующим агентом биосенсора на АА могут являться бактериальные клетки с амидазной активностью, иммобилизованные в структуре гелей немодифицированного или модифицированного углеродными нанотрубками альгината бария, агарозы, либо выращенные в виде биопленок на ТРГ. Наилучшими характеристиками (изменение электропроводности растворов АА при контакте с биоселектирующим агентом, высокая операционная стабильность, механическая прочность) обладали клетки *A. faecalis* 2, иммобилизованные в структуре геля агарозы. Биоселектирующий агент на их

основе способен долговременно храниться как во влажном состоянии при температуре от 4 до 25°C, так и при замораживании от –20 до –80°C. Время полужизни такого биоселектирующего агента составляло не менее 500 ч. В отличие от описанного в работе Сильвы и др. (Silva *et al.*, 2011) способа иммобилизации, который заключался в нанесении и высушивании суспензии предварительно обработанных 5%-ным глутаровым альдегидом клеток *P. aeruginosa* на мембранных дисках из полиэфирсульфона, нейлона и поликарбоната, предложены такие способы иммобилизации, как включение в гель агарозы и альгината бария, а также выращивание биопленок на ТРГ, которые позволят получить стабильный при эксплуатации и хранении биоселектирующий агент. Кроме того, предложено использование более простого и дешевого портативного анализатора и бактерий, которые в отличие от *P. aeruginosa* не проявляют потенциальной патогенности.

## 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 этих штаммов 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 многократное 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. Энергетический статус оценивали по содержанию внутриклеточного АТФ при 20-минутной экспозиции с 20–1000 мМ АА. 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 времени воздействия АА в концентрации 10–1500 мМ на люминесценцию генно-модифицированного штамма *E. coli* K12 TG1 (pXen7), который используется в качестве сенсора на токсичные вещества. При возрастании исследуемых концентраций соединения происходило снижение биолюминесценции. Гашение люминесценции на 50% (EC<sub>50</sub>) наблюдалось при концентрациях 500, 350, 250, 210, 190, 150 и 100 мМ АА за 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 120 мин соответственно. Штамм *E. coli* K12 TG1 (pXen7) может использоваться в качестве биосенсора на токсичные вещества, так как гашение люминесценции пропорционально концентрации токсиканта, однако, из-за неспецифичности ответа с его помощью невозможно определить присутствие АА в среде при наличии других токсичных веществ.

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 отсутствие роста в присутствии АА в концентрации от 500 мМ и выше у большинства штаммов, кроме *R. erythropolis* 11-2. При концентрации 250 мМ сохраняется от 0,016 до 0,116% жизнеспособных бактериальных клеток.

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. При возрастании концентраций АА происходило снижение количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем у большинства штаммов. Несмотря на это у родококков сохранялась метаболическая активность клеток даже в присутствии высоких концентраций АА. При этом *R. ruber* gt 1 проявил наиболее высокую устойчивость, тогда как *A. faecalis* 2, являясь грамотрицательным микроорганизмом, был более чувствителен к данному веществу по сравнению с родококками.

Изучена бактерицидность и мутагенная активность АА методом стандартного теста Эймса. Мутагенная активность АА исследована

полуколичественным методом с внесением 0,25–2500 мМ концентраций соединения в слой полужидкого агара (без метаболической активации). Выявлено, что АА не обладает выраженным бактерицидным действием по отношению к индикаторным штаммам *S. typhimurium* TA1535 и TA1538. Также АА не обладает генотоксичностью, а именно, не индуцирует ни мутаций типа сдвига рамки считывания, характерные для штамма TA1538, ни мутаций замены пар оснований – для штамма TA1535. Полученные результаты дополняют и подтверждают сведения научной литературы по изучению мутагенного эффекта АА. Следует отметить, что это соединение не является сильно токсичным для бактерий. Токсические свойства АА проявляются, главным образом, по отношению к высшим эукариотическим организмам, а не прокариотам.

Таким образом, влияние 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 является не целесообразным из-за отсутствия специфичности к этому соединению. На основании проведенных экспериментов можно заключить о необходимости разработки биосенсора на АА, обладающего специфичностью и чувствительностью к АА.

В связи с широким применением акриловых полимеров в качестве флокулянтов для очистки сточных вод 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.

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. Показано, что амидазосодержащие штаммы могут деградировать данные ПАА, используя их в качестве субстрата для роста, например в качестве источника азота с дополнительным источником углерода. При этом эффективность микробной деградации ПАА зависит от его

заряда. Так, катионный ПАА Праестол 857 BS в концентрации 0,05% был подвержен более эффективной микробной деградации, чем анионные ПАА Праестол 2530 и 2540. По-видимому, это связано с отсутствием электростатического отталкивания между отрицательно заряженной клеточной стенкой и молекулой полимера. Кроме этого, рост бактерий наблюдали в среде с неионогенным полимером в качестве источника азота с дополнительным источником углерода. 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 иммобилизация 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.

Биокатализаторы, полученные на основе иммобилизованных в структуре геля κ-каррагинана бактериальных клеток, наименее стабильные и прочные по сравнению с другими типами матриц. После проведения 1–3 циклов трансформации 100 мМ раствора АА в АК гранулы подверглись растворению. Возможно, это связано с физико-химическими характеристиками носителя или химической природой реакционной среды.

Количество АК, образованной биокатализаторами на основе клеток *R. erythropolis* 4-1, иммобилизованными включением в структуру гелей агарозы и альгината бария и на активированном и неактивированном хитозане, после 1 цикла снижается и остается примерно на одном уровне на протяжении всех циклов – 0,25–2 мг. Количество циклов иммобилизованных клеток в гелях составляет 18, на хитозане – 7.

Биокатализаторы на основе клеток *A. faecalis* 2, иммобилизованных включением в гели альгината бария и агарозы, оказались наиболее стабильными по

сравнению с клетками на активированном и неактивированном хитозане. Амидазная активность таких биокатализаторов сохранялась на протяжении 18 циклов. При этом наибольшее количество АК наблюдалось при иммобилизации в структуру альгинатного геля и составляло 70–100 мг. Следует отметить, что со временем альгинатные гранулы теряли механическую прочность и постепенно разрушались при многократном использовании, чего нельзя сказать про использование агарозы в качестве матрицы. Для повышения механической прочности альгинатных гранул были использованы углеродные нанотрубки. После 20 циклов трансформации АА в АК сохранялось 64% активности биокатализаторов на основе клеток *A. faecalis*, включенных в структуру геля альгината бария с МУНТ и предварительно смешанных с МУНТ до иммобилизации, от проявляемой в первых циклах. Также при длительной эксплуатации отмечалось улучшение прочности и стабильности гранул перед иммобилизованными клетками в структуре геля альгината бария без углеродных нанотрубок.

Биокатализаторы на основе биопленок *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2, выращенных на ТРГ, оказались наиболее стабильными по сравнению с адгезированными на ТРГ клетками. Амидазная активность таких биокатализаторов сохранялась на протяжении 30 циклов. Наибольшее количество АК образовывалось при трансформации АА биокатализатором на основе биопленок *R. erythropolis* 11-2 на 0,5 г ТРГ – 100–120 мг, биокатализатором на основе *A. faecalis* 2 – 80–100 мг. При этом биопленки *R. erythropolis* 11-2 на ТРГ способны конвертировать АА в АК более чем в 20 циклах реакции с сохранением не менее чем 50% амидазной активности.

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 и при –80°C. Амидазная активность высушенных биокатализаторов после хранения при комнатной температуре была ингибирована после второго цикла реакции. Оптимальным способом хранения биокатализаторов является замораживание.

Исходная активность таких биокатализаторов не снижалась на протяжении 7 циклов реакции. Кроме этого, биокатализаторы способны долговременно храниться и во влажном состоянии при температуре от 4 до 25°C. Однако альгинатные гранулы при таком способе хранения со временем могут терять свои свойства и постепенно разрушаться при проведении последовательных циклов реакции. Поэтому биокатализаторы, иммобилизованные в структуре агарозного геля, оказываются наиболее стабильными и механически прочными.

Разработан прототип биосенсора на АА на основе иммобилизованных на электроде амидазосодержащих бактериальных клеток. Принцип работы биосенсора заключается в трансформации АА в АК внутриклеточной амидазой и определении электропроводности раствора, которая возрастает при появлении в растворе АК. Определена электропроводность 5–100 мМ растворов АК и удельная электропроводность водного раствора при трансформации АА в АК иммобилизованными биокатализаторами на основе клеток *R. erythropolis* 11-2, *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2, включенных в структуру гелей альгината бария и агарозы. Наибольшая разница в электрической проводимости раствора происходила при трансформации АА клетками *A. faecalis* 2, иммобилизованными в структуре геля агарозы. В связи с этим была изучена динамика изменения электропроводности при трансформации 5–100 мМ АА в АК данным биокатализатором. Установлено, что в течение 1 ч увеличение электропроводности для всех изученных концентраций АА происходит линейно, предел определения составлял  $10^{-3}$  М.

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 обладали клетки *A. faecalis* 2, иммобилизованные в структуре геля агарозы. Такие биокатализаторы способны долговременно храниться как во влажном состоянии при температуре от 4 до 25°C, так и при замораживании от –20 до –80°C.

Таким образом, амидазосодержащие бактерии устойчивы к высоким концентрациям АА и являются основой биотехнологий, связанных с их 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 было показано, что *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 с амидазной активностью способны расти на ПАА и в перспективе могут участвовать в 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 ( $EC_{50}$ ) 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 к-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  $-20 \dots -80^{\circ}\text{C}$  или охлаждение до  $+4-6^{\circ}\text{C}$ . 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аликин, В.Н. Обезвреживание и утилизация отходов биотехнологического производства акриламида / В.Н. Аликин, В.И. Будников, А.Л. Каменщиков, Ф.И. Лобанов, Х.-Г. Хартан // Экология и промышленность России. – 2005. – С. 14–16.
2. Биосенсоры: основы и приложения: Пер. с англ. / Ред. Э. Тёрнера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – М.: Мир, 1992. – 614 с.
3. Варфоломеев, С.Д. Биосенсоры / С.Д. Варфоломеев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 1. – С. 45–49.
4. Глебова, Н.В. Терморасширенный графит как функциональный материал в технологии электродного материала со смешанной проводимостью / Н.В. Глебова, А.О. Краснова, А.А. Нечитайлов // Журнал прикладной химии. – 2018. – Т. 91, № 8. – С. 1111–1121.
5. Гулий, О.И. Иммобилизация микробных клеток на полимерных матрицах, модифицированных плазменной обработкой / О.И. Гулий, В.В. Симаков, О.А. Караваева, А.В. Смирнов // Прикл. биохим. микробиология. – 2020. – Т. 56, № 2. – С. 198–205.
6. Данилов, В.С. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / В.С. Данилов, А.П. Зарубина, Г.Е. Ерошников, Л.Н. Соловьева, Ф.В. Карташев, Г.Б. Завильгельский // Вест. Моск. ун-та. Сер.: Биол. – 2002. – № 3. – С. 20–24.
7. Дебабов, В.Г. Биокаталитический гидролиз нитрилов / В.Г. Дебабов, А.С. Яненко // Обзорный журнал по химии. – 2011. – Т. 1, № 4. – С. 376–394.
8. Демаков, В.А. Бактерии активного ила биологических очистных сооружений, трансформирующие цианопиридины и амиды пиридинкарбоновых кислот / В.А. Демаков, Д.М. Васильев, Ю.Г. Максимова, Ю.А. Павлова, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 3. – С. 369–378.
9. Ефременко, Е.Н. Иммобилизованные клетки в биокатализаторах и биопленках: свойства и общие закономерности их изменения В кн.

Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. / Е.Н. Ефременко / Ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. – С. 13–56.

10. Ефременко, Е.Н. Определение биolumинесцентным методом минимальных ингибирующих концентраций веществ по отношению к бактериям, участвующим в биокоррозии / Е.Н. Ефременко, Р.Э. Азизов, Т.А. Махлис, В.М. Аббасов, С.Д. Варфоломеев // Прикл. биохим. микробиол. – 2005. – Т. 41, № 4. – С. 429–434.

11. Китова, А.Е. Безмедиаторный микробный электрод на основе терморасширенного графита / А.Е. Китова, В.В. Колесов, А.Н. Решетилов // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2018. – №. 1. – С. 9–16.

12. Куликовский, А.В. Аналитический контроль пищевых систем на содержание акриламида методом высокoeffективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / А.В. Куликовский, Н.Л. Вострикова, О.А. Кузнецова, А.А. Семенова, А.Н. Иванкин // Аналитика и контроль. – 2019. – Т. 23, № 3. – С. 393–400.

13. Куц, В.В. Биolumинесцентный мониторинг экотоксикантов (экологическая люминометрия) / В.В. Куц, К.А. Аленина, О.В. Сенько, Е.Н. Ефременко, А.Д. Исмаилов // Вода: химия и экология. – 2011. – № 10. – С. 47–53.

14. Кремко, Л.М. Акриламид в питьевой воде. Разработка методики определения / Л.М. Кремко, О.В. Саракач, А.И. Докутович // Здоровье и окружающая среда. – 2012. – № 20. – С. 275–280.

15. Кремко, Л.М. Методы определения акриламида в воде и пищевых продуктах / Л.М. Кремко, О.В. Саракач, А.И. Докутович // Здоровье и окружающая среда. – 2011. – № 19. – С. 425–427.

16. Лопушанская, Е.М. Определение акриламида в воде методом ВЭЖХ/МС для обеспечения контроля качества питьевой воды / Е.М. Лопушанская, И.Б. Максакова, А.И. Крылов // Вода: Химия и Экология. – 2017. – № 10. – С. 3–10.

17. Максимов, А.Ю. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилутилизующих бактерий *Rhodococcus ruber* gt 1 и *Pseudomonas fluorescens* C2, иммобилизованными в структуре геля агарозы / А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков // Вест. Перм. ун-та. Сер.: Биол. – 2009. – №. 10(36). – С. 115–118.

18. Максимова, Ю.Г. Биodeградация акриламида и акриловой кислоты планктонными клетками и биопленками *Alcaligenes faecalis* 2 / Ю.Г. Максимова, Д.М. Васильев, А.С. Зорина, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов // Прикл. биохим. микробиология. – 2018. – Т. 54, № 2. – С. 158–164.
19. Максимова, Ю.Г. Трансформация амидов адгезированными клетками родококков, обладающими амидазной активностью / Ю.Г. Максимова, А.Н. Горбунова, А.С. Зорина, А.Ю. Максимов, Г.В. Овечкина, В.А. Демаков // Прикл. биохим. микробиология. – 2015. – Т. 51, № 1. – С. 53–58.
20. Максимова, Ю.Г. Биodeградация полиакриламидов почвенной микрофлорой и штаммами амидазосодержащих бактерий / Ю.Г. Максимова, А.А. Горшкова, В.А. Демаков // Вест. Перм. гос. ун-та. Сер.: Биол. – 2017. – №. 2. – С. 200–204.
21. Максимова, Ю.Г. Полимерные гидрогели в сельском хозяйстве / Ю.Г. Максимова, В.А. Щетко, А.Ю. Максимов // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т. 58. – № 1. – С. 23–42.
22. Максимова, Ю.Г. Биоаугментация акриламид-деградирующих бактерий в микробиоте речного ила / Ю.Г. Максимова, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов // Вода и экология: проблемы и решения. – 2021. – № 3(87). – С. 56–65.
23. Максимова, Ю.Г. Биокатализаторы на основе клеток бактериальных штаммов с амидазной активностью для синтеза акриловой кислоты из акриламида / Ю.Г. Максимова, М.С. Якимова, А.Ю. Максимов // Катализ в промышленности. – 2019. – Т. 19, № 1. – С. 73–79.
24. Мамичев, Д.А. Оптические сенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса для высокочувствительного биохимического анализа / Д.А. Мамичев, И.А. Кузнецов, Н.Е. Маслова, М.Л. Занавескин // Молекулярная медицина. – 2012. – № 6. – С. 19–27.
25. Маслова, О.В. Имобилизованные клетки бактерий, обладающих биолюминесценцией, в системах биодетекции и экомониторинга. В кн. Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. / О.В. Маслова, О.В. Сенько, А.В. Холстов, А.Д. Исмаилов, Е.Н. Ефременко / Ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. – С. 253–288.

26. Мочалова, Е.М. Иммобилизация клеток нитрилгидролизующих бактерий *Rhodococcus erythropolis* 4-1 и *Alcaligenes faecalis* 2 с использованием термотропных и ионотропных гелей / Е.М. Мочалова, Ю.Г. Максимова // Вест. Перм. ун-та. Сер.: Биол. – 2020. – №. 1. – С. 26–32.
27. Нилова, Л.П. Проблемы безопасности хлебобулочных изделий: акриламид / Л.П. Нилова, С.М. Малютенкова, А.А. Вытовтов // Продукты питания и биотехнологии. – 2017. – Т. 5, № 1. – С. 74–81.
28. Павлова, Ю.А. Сравнительный анализ последовательностей генов амидаз почвенных актинобактерий рода *Rhodococcus* / Ю.А. Павлова, А.Н. Неустроева, А.Ю. Максимов // Изв. Самар. науч. цент. Рос. акад. наук. – 2011. – Т. 13, № 5(3). – С. 272–276.
29. Перчиков, Р.Н. Формирование биопленок микроорганизмов активного ила на поверхности электрода как основа высокочувствительного БПК-биосенсора / Р.Н. Перчиков, В.А. Арляпов // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2023. – № 1. – С. 69–81.
30. Плеханова, Ю.В. Микробные биосенсоры для определения пестицидов / Ю.В. Плеханова, А.Н. Решетилов // Журнал аналитической химии. – 2019. – Т. 74, № 12. – С. 883–901.
31. Плотникова, Е.Г. Цельноклеточные бактериальные биосенсоры для детекции ароматических углеводов и их хлорированных производных (обзор) / Е.Г. Плотникова, Е.С. Шумкова, М.С. Шумков // Прикл. биохим. микробиология. – 2016. – Т. 52, № 4. – С. 353–364.
32. Полтавская, С.В. Разработка и внедрение биокаталитического способа получения акриловой кислоты. I. Выделение штамма *Alcaligenes denitrificans*, трансформирующего акрилонитрил в акрилат аммония. Оптимизация среды культивирования / С.В. Полтавская, Т.Н. Козулина, И.Н. Сингирцев, С.В. Козулин, Г.М. Шуб, С.П. Воронин // Биотехнология. – 2004. – № 1. – С. 62–70.
33. Понаморева, О.Н. Биосенсоры и биотопливные элементы на основе целых клеток микроорганизмов и выделенных из них ферментов. Обзор / О.Н. Понаморева // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2009. – № 1. – С. 138–157.

34. Понаморева, О.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода (обзор) / О.Н. Понаморева, В.А. Арляпов, В.А. Алфёров, А.Н. Решетилов // Прикл. биохим. микробиология. – 2011. – Т. 47, № 1. – С. 5–15.
35. Ревин, В.В. Введение в биотехнологию: от пробирки до биореактора: учеб. пособие / В.В. Ревин, Д.А. Кадималиев, Н.А. Атыкян. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2006. – 256 с.
36. Решетилов, А.Н. Биосенсоры и биотопливные элементы: исследования, ориентированные на практическое применение (обзор) / А.Н. Решетилов // Прикл. биохим. микробиология. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 268–274.
37. Решетилов, А.Н. Биосенсорные системы и топливные элементы на основе микробных клеток. В кн. Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. / А.Н. Решетилов, Ю.В. Плеханова / Ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. – С. 207–252.
38. Рогачева, С.М. Разработка биотехнологического способа утилизации полиакрилатов / С.М. Рогачева, Т.Н. Козулина, Е.В. Кулакова // Управление муниципальными отходами как важный фактор устойчивого развития мегаполиса: мат. Междунар. конф. (СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 4–6 окт. 2018 г.) / СПб., 2018. – С. 142–145.
39. Романова, Н.А. Сравнение методов экстракции внутриклеточного АТФ микроорганизмов различного типа для биолюминесцентного определения клеток микроорганизмов / Н.А. Романова, Л.Ю. Бровко, Н.Н. Угарова // Прикл. биохим. микробиол. – 1997. – Т. 33, № 3. – С. 344–349.
40. Россинская, И.В. Детекция капролактама двумя типами микробных биосенсоров / И.В. Россинская, О.Н. Понаморёва, В.А. Алфёров, Ю.А. Власова, Т.З. Есикова, А.Н. Решетилов // Вода: Химия и Экология. – 2008. – № 1. – С. 30–35.
41. Сазыкина, М.А. Использование биосенсоров для детекции антропогенного загрязнения природных вод / М.А. Сазыкина, Е.А. Мирина, И.С. Сазыкин // Вода: Химия и Экология. – 2015. – № 10. – С. 64–74.

42. Смагин, А.В. Биодеструкция сильнонабухающих полимерных гидрогелей и ее влияние на водоудерживающую способность почв / А.В. Смагин, Н.Б. Садовникова, М.В. Смагина // Почвоведение. – 2014. – № 6. – С. 716–723.
43. Шемшединова, Э.Ш. Люминесцентные цельноклеточные биосенсоры в детекции экотоксикантов (обзор) / Э.Ш. Шемшединова, Э.Р. Абдураманова, Е.В. Морозкина, А.М. Кацев // Теоретическая и прикладная экология. – 2020. – № 2. – С. 6–13.
44. Akbar, M. Novel insight into the degradation of polyacrylamide by thermophilic anaerobic digestion / M. Akbar, M.F.S. Khan, M. Abid // Biochem. Engin. J. – 2022. – V. 189. – Article 108716.
45. Alvarez, G.S. Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol-gel-derived silica matrices / G.S. Alvarez, M.L. Foglia, G.J. Copello, M.F. Desimone, L.E. Diaz // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – V. 82, № 4. – P. 639–646.
46. Ames, B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria / B.N. Ames // Chemical Mutagens. – 1971. – V. 1. – P. 267–282.
47. Ames, B.N. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens / B.N. Ames, F.D. Lee, W.E. Durston // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1973. – V. 70, № 3. – P. 782–786.
48. Ames, B.N. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test / B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki // Mutat. Res. – 1975. – V. 31, № 6. – P. 347–363.
49. Aras, D. *In vivo* acrylamide exposure may cause severe toxicity to mouse oocytes through its metabolite glycidamide / D. Aras, Z. Cakar, S. Ozkavukcu, A. Can, O. Cinar // PLoS One. – 2017. – V. 12, № 2.
50. Arvanitoyannis, I.S. Acrylamide: Formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation / I.S. Arvanitoyannis, N. Dionisopoulou // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2014. – V. 54, № 6. – P. 708–733.

51. Asal, M. An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors / M. Asal, Ö. Özen, M. Şahinler, H.T. Baysal, İ. Polatoğlu // *Sensor Review*. – 2019. – V. 39, № 3. – P. 377–386.
52. Batra, B. Detection of acrylamide by biosensors / B. Batra, C.S. Pundir // *Acrylamide in Food*. – 2016. – P. 497–505.
53. Batra, B. Construction of an improved amperometric acrylamide biosensor based on hemoglobin immobilized onto carboxylated multi-walled carbon nanotubes/iron oxide nanoparticles/chitosan composite film / B. Batra, S. Lata, C.S. Pundir // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2013. – V. 36, № 11. – P. 1591–1599.
54. Batra, B. An acrylamide biosensor based on immobilization of hemoglobin onto multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaniline hybrid film / B. Batra, S. Lata, M. Sharma, C.S. Pundir // *Anal. Biochem.* – 2013. – V. 433, № 2. – P. 210–217.
55. Bedade, D.K. Isolation and characterization of acrylamidase from *Arthrobacter* sp. DBV1 and its ability to biodegrade acrylamide / D.K. Bedade, R.S. Singhal // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2017. – V. 182. – P. 570–585.
56. Bedade, D.K. Biodegradation of acrylamide by a novel isolate, *Cupriavidus oxalaticus* ICTDB921: Identification and characterization of the acrylamidase produced / D.K. Bedade, R.S. Singhal // *Bioresource Technology*. – 2018. – V. 261. – P. 122–132.
57. Bedade, D.K. Bioreactor studies on acrylamidase produced from *Cupriavidus oxalaticus* ICTDB921: Production, kinetic modeling, and purification / D.K. Bedade, M.J. Dev, R.S. Singhal // *Biochem. Eng.* – 2019. – V. 149. – P. 107245.
58. Besaratinia, A. DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide / A. Besaratinia, G.P. Pfeifer // *Mutat. Res.* – 2005. – V. 580. – P. 31–40.
59. Buranasilp, K. Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter aerogenes* isolated from wastewater in Thailand / K. Buranasilp, J. Charoenpanich // *J. Environ. Sci.* – 2011. – V. 23, № 3. – P. 396–403.
60. Caulfield, M.J. Degradation on polyacrylamides. Part I. Linear polyacrylamide / M.J. Caulfield, X. Hao, G.G. Qiao, D.H. Solomon // *Polymer*. – 2003. – V. 44, № 5. – P. 1331–1337.

61. Chand, D. Treatment of simulated wastewater containing toxic amides by immobilized *Rhodococcus rhodochrous* NHB-2 using a highly compact 5-stage plug flow reactor / D. Chand, H. Kumar, U.D. Sankhian, D. Kumar, F. Vitzthum, T.C. Bhalla // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – V. 20. – P. 679–686.
62. Charoenpanich, J. Removal of acrylamide by microorganisms / J. Charoenpanich // Appl. Bioremed. – Active and Passive Approaches. – 2013. – P. 101–121.
63. Craciun, G. Flocculant based on acrylamide and acrylic acid grafted on sodium alginate by electron beam irradiation / G. Craciun, E. Manaila, D. Ighigeanu // Materiale Plastice. – 2019. – V. 56, № 1. – P. 124–128.
64. Dearfield, K.L. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity / K.L. Dearfield, C.O. Abernathy, M.S. Ottley, J.H. Brantner, P.F. Hayes // Mutat. Res. – 1988. – V. 195, № 1. – P. 45–77.
65. Demirhan, B. Rapid detection of acrylamide in food using Mn-doped ZnS quantum dots as a room temperature phosphorescent probe / B. Demirhan, B.E. Demirhan, N. Ertas, H.E.S. Kara // Food Anal. Methods. – 2018. – V. 11. – P. 1367–1373.
66. Duda-Chodak, A. A review of the interactions between acrylamide, microorganisms and food components / A. Duda-Chodak, Ł. Wajda, T. Tarko, P. Sroka, P. Satora // Food Funct. – 2016. – V. 7, № 3. – P. 1282–1295.
67. Efremenko, E.N. An approach to the rapid control of oil spill bioremediation by bioluminescent method of intracellular ATP determination / E.N. Efremenko, R.E. Azizov, A.A. Raeva, V.M. Abbasov, S.D. Varfolomeyev // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2005. – V. 56, № 2. – P. 94–100.
68. El-Assouli, S.M. Acrylamide in selected foods and genotoxicity of their extracts / S.M. El-Assouli // Egypt Public Health Assoc. – 2009. – V. 84, № 3. – P. 369–390.
69. Eleftheriou, N.M. Entrapment of living bacterial cells in low-concentration silica materials preserves cell division and promoter regulation / N.M. Eleftheriou, X. Ge, J. Kolesnik, S.B. Falconer, R.J. Harris, C. Khursigara, E.D. Brown, J.D. Brennan // Chem. Mater. – 2013. – V. 25, № 23. – P. 4798–4805.

70. Eş, I. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application / I. Eş, J.D.G. Vieira, A.C. Amaral // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – V. 99, № 5. – P. 2065–2082.
71. Fleming, D.L. Evaluating bacterial cell immobilization matrices for use in a biosensor. 2004.
72. Gafar, A.A. Characterization of an acrylamide-degrading bacterium and its degradation pathway / A.A. Gafar, M.Y. Shukor // JEMAT. – 2018. – V. 6, № 2. – P. 29–33.
73. Gafar, A.A. Acrylamide toxicity and its biodegradation / A.A. Gafar, M.E. Khayat, M.B.H.A. Rahim, M.Y. Shukor // BSTR. – 2017. – V. 5, № 2. – P. 8–12.
74. Gaytán, I. Current status on the biodegradability of acrylic polymers: microorganisms, enzymes and metabolic pathways involved / I. Gaytán, M. Burelo, H. Loza-Tavera // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2021. – V. 105. – P. 991–1006.
75. Giese, E.C. Immobilized microbial nanoparticles for biosorption / E.C. Giese, D.D.V. Silva, A.F.M. Costa, S.G.C. Almeida, K.J. Dussán // Critical Reviews in Biotechnology. – 2020. – V. 40, № 5. – P. 653–666.
76. Gilbert, W.J.R. Enzymatic degradation of polyacrylamide in aqueous solution with peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / W.J.R. Gilbert, S.J. Johnson, J.-S. Tsau, J.-T. Liang, A.M. Scurto // J. Appl. Polym. Sci. – 2017. – V. 134, № 10. – Article 44560.
77. Guezennec, A.G. Transfer and degradation of polyacrylamide based flocculants in hydrosystems: a review / A.G. Guezennec, C. Michel, K. Bru, S. Touzé, N. Desroche, I. Mnif, M. Motelica-Heino // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. – 2015. – V. 22. – P. 6390–6406.
78. Hashimoto, K. Mutagenicity of acrylamide and its analogues in *Salmonella typhimurium* / K. Hashimoto, H. Tanii // Mutat. Res. – 1985. – V. 158, № 3. – P. 129–133.
79. Hu, Q. Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review / Q. Hu, X. Xu, Y. Fu, Y. Li // Food Control. – 2015. – V. 56. – P. 135–146.
80. Hu, Q. Detection of acrylamide in potato chips using a fluorescent sensing method based on acrylamide polymerization-induced distance increase between quantum dots /

- Q. Hu, X. Xu, Z. Li, Y. Zhang, J. Wang, Y. Fu, Y. Li // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – V. 54. – P. 64–71.
81. Huang, S. An electrochemical biosensor based on single-stranded DNA modified gold electrode for acrylamide determination / S. Huang, S. Lu, C. Huang, J. Sheng, L. Zhang, W. Su, Q. Xiao // *Sensors and Actuators B: Chemical.* – 2016. – V. 224. – P. 22–30.
82. Ignatov, O.V. Acrylamide and acrylic acid determination using respiratory activity of microbial cells / O.V. Ignatov, S.M. Rogatcheva, S.V. Kozulin, N.A. Khorkina // *Biosens. Bioelectron.* – 1997. – V. 12, № 2. – P. 105–111.
83. Jangkorn, S. Comparative study of *Enterobacter aerogenes* and mixed-culture bacteria for acrylamide biodegradation in sequencing batch reactor wastewater-treatment systems / S. Jangkorn, J. Charoenpanich, T. Sriwiriyarat // *J. Environ. Eng.* – 2018. – V. 144, № 3. – 04017112.
84. Jebasingh, S.E.J. Biodegradation of acrylamide and purification of acrylamidase from newly isolated bacterium *Moraxella osloensis* MSU11 / S.E.J. Jebasingh, M. Lakshmikandan, R.P. Rajesh, P. Raja // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2013. – V. 85. – P. 120–125.
85. Jiang, C. Neighboring group effect on the thermal degradation of polyacrylamide and its derivatives / C. Jiang, X. Xia, S. Kang, H. Dong, P. Sakinejad, Q. Ma, Y. Tang // *J. Polym. Eng.* – 2019. – V. 39, № 3. – P. 239–247.
86. Joshi, S.J. Biodegradation of polyacrylamide and its derivatives / S.J. Joshi, R.M.M. Abed // *Environ. Process.* – 2017. – V. 4. – P. 463–476.
87. Kamal, A. Bioconversion of acrylonitrile to acrylic acid from *Rhodococcus ruber* AKSH-84 / A. Kamal, M.S. Kumar, C.G. Kumar, T.B. Shaik // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 21, № 1. – P. 37–42.
88. Kepekci Tekkeli, S.E. A review of current methods for the determination of acrylamide in food products / S.E. Kepekci Tekkeli, C. Önal, A. Önal // *Food Anal. Methods.* – 2012. – V. 5. – P. 29–39.
89. Knaap, A.G.A.C. Mutagenic activity of acrylamide in eukaryotic systems but not in bacteria / A.G.A.C. Knaap, P.G.N. Kramers, C.E. Voogd, W.G.M. Bergkamp, M.G.

- Groot, P.G. Langebroek, H.C.A. Mout, J.J. van der Stel, H.W. Verharen // *Mutagenesis*. – 1988. – V. 3, № 3. – P. 263–268.
90. Krajewska, A. A voltammetric biosensor based on glassy carbon electrodes modified with single-walled carbon nanotubes/Hemoglobin for Detection of Acrylamide in Water Extracts from Potato Crisps / A. Krajewska, J. Radecki, H. Radecka // *Sensors*. – 2008. – V. 8, № 9. – P. 5832–5844.
91. Kusnin, N. Toxicity, pollution and biodegradation of acrylamide – a mini review / N. Kusnin, M.A. Syed, S.A. Ahmad // *JOBIMB*. – 2015. – V. 3, № 2. – P. 6–12.
92. Lakshmikandan, M. Biodegradation of acrylamide by acrylamidase from *Stenotrophomonas acidaminiphila* MSU12 and analysis of degradation products by MALDI-TOF and HPLC / M. Lakshmikandan, K. Sivaraman, S.E. Raja, P. Vasanthakumar, R.P. Rajesh, K. Sowparthani, S.E.J. Jebasingh // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2014. – V. 94. – P. 214–221.
93. Li, D. A label-free electrochemical biosensor for acrylamide based on DNA immobilized on graphene oxide-modified glassy carbon electrode / D. Li, Y. Xu, L. Zhang, H. Tong // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2014. – V. 9, № 17. – P. 7217–7227.
94. Liu, C. Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods / C. Liu, F. Luo, D. Chen, B. Qiu, X. Tang, H. Ke, X. Chen // *Talanta*. – 2014. – V. 123. – P. 95–100.
95. Lobsiger, N. Strategies of immobilizing cells in whole-cell microbial biosensor devices targeted for analytical field applications/ N. Lobsiger, J.W. Stark // *Anal Sci.* – 2019. – V. 35, № 8. – P. 839–847.
96. Madmanang, R. Kinetics of nitrification and acrylamide biodegradation by *Enterobacter aerogenes* and mixed culture bacteria in sequencing batch reactor wastewater treatment systems / R. Madmanang, S. Jangkorn, J. Charoenpanich, T. Sriwiriyarat // *Environ. Eng. Res.* – 2019. – V. 24, № 2. – P. 309–317.
97. Maksimov, A.Yu. Effects of nitriles and amides on the growth and nitrile hydratase activity of the *Rhodococcus* sp. strain gt 1 / A.Yu. Maksimov, M.V. Kuznetsova, G.V. Ovechkina, S.V. Kozlov, Yu.G. Maksimova, V.A. Demakov // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2003. – V. 39, № 1. – P. 55–59.

98. Maksimova, Yu.G. Temperature dependence of the processes of acrylamide biodegradation in river silt suspensions at their inoculation by selected bacterial strains / Yu.G. Maksimova, G.V. Ovechkina, A.A. Selyaninov, A.A. Baranova, A.Yu. Maksimov // *Water Resources*. – 2020. – V. 47. – P. 130–136.
99. Martínez, E. Use of 2-naphthalenethiol for derivatization and determination of acrylamide in potato crisps by high-performance liquid chromatographic with fluorescence detection / E. Martínez, J.A. Rodríguez, M. Bautista, E. Rangel-Vargas, E.M. Santos // *Food Anal. Methods*. – 2018. – V. 11, № 6. – P. 1636–1644.
100. Martins, S.C.S. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater / S.C.S. Martins, C.M. Martins, L.M.C.G. Fiúza, S.T. Santaella // *African Journal of Biotechnology*. – 2013. – V. 12, № 28. – P. 4412–4418.
101. Micheline, E. Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes / E. Micheline, A. Roda // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 402, № 5. – P. 1785–1797.
102. Murugan, P. Recent trends in the applications of thermally expanded graphite for energy storage and sensors – a review / P. Murugan, R.D. Nagarajan, B.H. Shetty, M. Govindasamy, A.K. Sundramoorthy // *Nanoscale Adv.* – 2021. – V. 3, № 22. – P. 6294–6309.
103. Nada, A. Evolution of acrylamide detection methods in cooked foods since its firstly discovered in 2002 / A. Nada, A. Ali, G. Ingolf // *SCVMJ*. – 2018. – V. 23, № 2. – P. 143–155.
104. Norouzi, E. Acrylamide in bread samples: Determining using ultrasonic-assisted extraction and microextraction method followed by gas chromatography-mass spectrometry / E. Norouzi, M. Kamankesh, A. Mohammadi, A. Attaran // *J. Cereal Science*. – 2018. – V. 79. – P. 1–5.
105. Nyssölä, A. Microbial degradation of polyacrylamide and the deamination product polyacrylate / A. Nyssölä, J. Ahlgren // *Inter. Biodeterioration and Biodegradation*. – 2019. – V. 139. – P. 24–33.

106. Oracz, J. New trends in quantification of acrylamide in food products / J. Oracz, E. Nebesny, D. Zyżelewicz // *Talanta*. – 2011. – V. 86. – P. 23–34.
107. Pan, M. Review of research into the determination of acrylamide in foods / M. Pan, K. Liu, J. Yang, L. Hong, X. Xie, S. Wang // *Foods*. – 2020. – V. 9, № 4. – P. 524.
108. Pundir, C.S. Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review / C.S. Pundir, N. Yadav, A.K. Chhillar // *Trends in Food Science and Technology*. – 2019. – V. 85. – P. 211–225.
109. Quan, Y. Development of an enhanced chemiluminescence ELISA for the rapid detection of acrylamide in food products / Y. Quan, M. Chen, Y. Zhan, G. Zhang // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. – V. 59. – P. 6895–6899.
110. Radwan, M.A. Ecotoxicological biomarkers as investigating tools to evaluate the impact of acrylamide on *Theba pisana* snails / M.A. Radwan, K.S. El-Gendy, A.F. Gad, A.E. Khamis, E.H. Eshra // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2019. – V. 26. – P. 14184–14193.
111. Rivas-Jimenez, L. Evaluation of acrylamide-removing properties of two *Lactobacillus* strains under simulated gastrointestinal conditions using a dynamic system / L. Rivas-Jimenez, K. Ramírez-Ortiz, A.F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba, H.S. Garcia, A. Hernandez-Mendoza // *Microbiol. Res.* – 2016. – V. 190. – P. 19–26.
112. Rosén, J. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry / J. Rosén, K. Hellenäs // *Analyst*. – 2002. – V. 127. – P. 880–882.
113. Rotariu, L. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective / L. Rotariu, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, C. Bala // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 79. – P. 80–87.
114. Sansano, M. Dietary acrylamide: What happens during digestion / M. Sansano, A. Heredia, I. Peinado, A. Andrés // *Food Chem.* – 2017. – V. 237. – P. 58–64.
115. Silva, N. Biosensor for acrylamide based on an ion-selective electrode using whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* containing amidase activity / N. Silva, D. Gil, A.

- Karmali, M. Matos // *Biocatalysis and Biotransformation*. – 2009. – V. 27, № 2. – P. 143–151.
116. Silva, N.A.F. An electrochemical biosensor for acrylamide determination: merits and limitations / N.A.F. Silva, M.J. Matos, A. Karmali, M.M. Rocha // *Portugaliae Electrochimica Acta*. – 2011. – V. 29, № 5. – P. 361–373.
117. Sharma, M. Amidases: versatile enzymes in nature / M. Sharma, N.N. Sharma, T.C. Bhalla // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2009. – V. 8. – P. 343–366.
118. Shoaie, N. Electrochemical sensors and biosensors based on the use of polyaniline and its nanocomposites: a review on recent advances / N. Shoaie, M. Daneshpour, M. Azimzadeh, S. Mahshid, S.M. Khoshfetrat, F. Jahanpeyma, A. Gholaminejad, K. Omidfar, M. Foruzandeh // *Microchim. Acta*. – 2019. – V. 186, № 7. P. 465.
119. Sjahrir, F. Biotransformation of acrylonitrile using immobilized cells of *Rhodococcus* UKMP-5M as biocatalyst / F. Sjahrir, M.N. Maniyam, A.L. Ibrahim, A.E.G. Cass // *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. – 2016. – V. 6, № 1. – P. 58–67.
120. Spencer, H. Toxicity evaluation of acrylamide on the early life stages of the Zebrafish embryos (*Danio rerio*) / H. Spencer, J. Wahome, M. Haasch // *JEP*. – 2018. – V. 9. – P. 1082–1091.
121. Stobiecka, A. Novel voltametric biosensor for determining acrylamide in food samples / A. Stobiecka, H. Radecka, J. Radecki // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – V. 22. – P. 2165–2170.
122. Sun, X. Development of a novel electrochemical sensor using pheochromocytoma cells and its assessment of acrylamide cytotoxicity / X. Sun, J. Ji, D. Jiang, X. Li, Y. Zhang, Z. Li, Y. Wu // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – V. 44. – P. 122–126.
123. Tepe, Y. Acrylamide in surface and drinking water / Y. Tepe // *Acrylamide in Food*. – 2015. – P. 275–293.
124. Tepe, Y. Acrylamide in environmental water: a review on sources, exposure, and public health risks / Y. Tepe, A. Çebi // *Exposure and Health*. – 2019. – V. 11. – P. 3–12.

125. Tsuda, H. Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations / H. Tsuda, C.S. Shimizu, M.K. Taketomi, M.M. Hasegawa, A. Hamada, K.M. Kawata, N. Inui // *Mutagenesis*. – 1993. – V. 8, № 1. – P. 23–29.
126. Uranta, K.G. Application of polymer integration technique for enhancing polyacrylamide (PAM) performance in high temperature and high salinity reservoirs / K.G. Uranta, S.R. Gomari, P. Russell, F. Hamad // *Heliyon*. – 2019. – V. 5, № 7. e02113.
127. Wampler, D.A. Photoheterotrophic metabolism of acrylamide by a newly isolated strain of *Rhodopseudomonas palustris* / D.A. Wampler, S.A. Ensign // *Appl. environment. microbiol.* – 2005. – V. 71, № 10. – P. 5850–5857.
128. Wang, A.Q. Degradation of acrylamide during chlorination as a precursor of haloacetonitriles and haloacetamides / A.Q. Wang, Y.L. Lin, B. Xu, C.Y. Hu, M.S. Zhang, S.J. Xia, T.Y. Zhang, W.H. Chu, N.Y. Gao // *Sci. Total Environ.* – 2018. – V. 615. – P. 38–46.
129. Wang, Y.S. Enantioselective hydrolysis of (R)-2,2-dimethylcyclopropane carboxamide by immobilized cells of an *R*-amidase-producing bacterium, *Delftia tsuruhatensis* CCTCC M 205114, on an alginate capsule carrier / Y.S. Wang, R.C. Zheng, J.M. Xu, Z.Q. Liu, F. Cheng, Z.H. Feng, L.L. Liu, Y.G. Zheng, Y.C. Shen // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V. 37. – P. 503–510.
130. Wei, H. Coagulation/flocculation in dewatering of sludge: a review / H. Wei, B. Gao, J. Ren, A. Li, H. Yang // *Water Research*. – 2018. – V. 143. – P. 608–631.
131. Wenzl, T. Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review / T. Wenzl, M.B. De La Calle, E. Anklaam // *Food Addit. Contam.* – 2003 – V. 20, № 10. – P. 885–902.
132. Xie, L. Highly efficient degradation of polyacrylamide by an Fe-doped  $\text{Ce}_{0.75}\text{Zr}_{0.25}\text{O}_2$  solid solution/CF composite cathode in a heterogeneous electro-fenton process / L. Xie, X. Mi, Y. Liu, Y. Li, Y. Sun, S. Zhan, W. Hu // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2019. – V. 11. – P. 30703–30712.

133. Xiong, B. Polyacrylamide degradation and its implications in environmental systems / B. Xiong, R.D. Loss, D. Shields, T. Pawlik, R. Hochreiter, A.L. Zydney, M. Kumar // *npj Clean Water*. – 2018. – V. 1, № 17. – P. 1–9.
134. Yadav, N. Preparation, characterization and application of hemoglobin nanoparticles for detection of acrylamide in processed foods / N. Yadav, A.K. Chhillar, C.S. Pundir // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – V. 107. – P. 1000–1013.
135. Yoetz-Kopelman, T. «Cells-on-beads»: A novel immobilization approach for the construction of whole-cell amperometric biosensors / T. Yoetz-Kopelman, Y. Dror, Y. Shacham-Diamand, A. Freeman // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2016. – V. 232. – P. 758–764.
136. Zhu, Y. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for acrylamide detection based on a monoclonal antibody / Y. Zhu, S. Song, L. Liu, H. Kuang, C. Xu // *Food and Agricultural Immunology*. – 2016. – V. 27, № 6. – P. 796–805.