

УДК 579.22

ВЛИЯНИЕ АКРИЛАМИДА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ БАКТЕРИЙ РАЗНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП

© 2020 г. Ю. Г. Максимова^{1,2,*}, Е. М. Мочалова²,
член-корреспондент РАН В. А. Демаков^{1,2}

Поступило 14.02.2020 г.
После доработки 03.03.2020 г.
Принято к публикации 03.03.2020 г.

Изучали влияние акриламида на содержание внутриклеточного АТФ в клетках бактерий родов *Rhodococcus* и *Alcaligenes* свечение генноинженерного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 (pXen7) и выживаемость бактерий различных систематических групп. По уровню снижения концентрации внутриклеточного АТФ установлено, что наиболее чувствительным к акриlamиду при 20-минутной экспозиции являлся штамм с более низкой амидазной активностью (*R. erythropolis*) и граммотрицательные протеобактерии *A. faecalis*, тогда как устойчивым – штамм *R. ruber*, обладающий высокой нитрилгидратазной активностью в сочетании с низкой амидазной активностью. Для штамма *E. coli* K12 TG1 (pXen7) ЕС50 акриламида за 2 ч составляла 7.1 г/л. Акриламид в концентрации 10–20 мМ, добавленный в среду культивирования, приводил к незначительному снижению количества КОЕ родококков, *A. faecalis* и *E. coli* по сравнению с контролем. При концентрации акриламида 250 мМ сохранялось от 0.016 до 0.116% жизнеспособных бактериальных клеток, а раствор 500 мМ и выше подавлял рост большинства изученных штаммов. Полученные результаты подтверждают, что акриламид гораздо менее токсичен для прокариотов, чем для эукариотов.

Ключевые слова: акриламид, прокариоты, токсичность, биолюминесценция, амидазная активность, АТФ

DOI: 10.31857/S2686738920030087

Акриламид является высокотоксичным соединением для животных и человека и обладает по отношению к ним мутагенным, тератогенным и канцерогенным эффектом. В окружающую среду акриламид попадает в основном со стоками предприятий по синтезу акриловых полимеров, кроме того, имеются многочисленные данные об образовании акриламида в пище и напитках при высокотемпературном взаимодействии аспарагина с соединениями, имеющими α -гидроксикарбонильные группы (восстанавливающими сахарами), известном как реакция Майяра [1, 2].

Взаимодействие этого токсичного вещества с микроорганизмами привлекает внимание исследователей в связи с изучением его биодеградации

в окружающей среде и воздействия на микрофлору кишечника. 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. Среди бактерий, утилизирующих акриламид, изолированы представители родов *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Stenotrophomonas* и др. [3–8]. Есть сведения о том, что клеточная стенка лактобацилл может связывать акриламид, снижая тем самым его всасывание в пищеварительном тракте [9]. Однако остается не до конца выясненной степень токсичности этого вещества по отношению к прокариотам.

В связи с этим, целью нашей работы явилось изучение влияния акриламида на энергетическое состояние и выживаемость бактерий родов *Rhodococcus*, *Alcaligenes* и *Escherichia coli*.

Объектами исследования являлись штаммы *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. erythropolis* 6-21, *R. ruber* gt1, *Alcaligenes faecalis* 2,

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, Пермский федеральный исследовательский центр, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

*e-mail: maks@iegm.ru; yul_max@mail.ru

обладающие ферментами гидролиза нитрилов, а также *Escherichia coli* K12 и *E. coli* K12 TG1 (pXen7).

Все эксперименты проводили не менее чем в 3-х кратной повторности. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента, $p < 0.05$.

Нитрилгидратазную и амидазную активность клеток определяли при культивировании штаммов на жидкой минимальной солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 3.75, NaCl – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005, pH 7.2 \pm 0.2. Источником азота для штамма *R. ruber* gt1 служил хлористый аммоний в концентрации 10 мМ, для *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. erythropolis* 6-21 – ацетонитрил в концентрации 0.05%; источником углерода для всех перечисленных штаммов – 0.1% глюкоза. Для штамма *A. faecalis* 2 единственным источником углерода и азота был 0.1 М ацетамид. Нитрилгидратазную и амидазную активность клеток определяли в процессе реакции трансформации 0.6 М акрилонитрила и 0.1 М акриламида, соответственно, в 0.01 М калий-фосфатном буфере (pH 7.2 \pm 0.2) при 22°C в течение 10–60 мин. Концентрацию акриламида, акриловой кислоты и акрилонитрила определяли методом ВЭЖХ (LC-10, “Shimadzu”, Япония) на колонке (250 \times 4.6 мм) Synergi 4u Hydro–RP 80A. В качестве подвижной фазы использовали 25 мМ NaH_2PO_4 , со скоростью потока 0.75 мл/мин при 25°C. Удельную активность определяли как количество клеток, мг (г), трансформирующих 1 мкмоль (1 ммоль) субстрата в продукт за 1 мин (1 ч) и выражали в мкмоль/мг/мин (ммоль/г/ч).

Штаммы *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. erythropolis* 6-21 и *A. faecalis* 2 проявляли выраженную амидазную активность, а наиболее активной нитрилгидратазой обладал штамм *R. ruber* gt1 (150–200 мкмоль/мг/мин), тогда как амидаза этого штамма была неактивна. Амидазная активность *R. erythropolis* 6-21, *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2 составляла 4, 9, и 14 ммоль/г/ч, соответственно, а увеличение концентрации акриламида до 500 мМ не приводило к ингибированию активности фермента.

Энергетический статус оценивали по содержанию АТФ в клетках бактериальных штаммов *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. erythropolis* 6-21, *R. ruber* gt1 и *A. faecalis* 2 после воздействия растворов акриламида в концентрациях 20, 50, 100 и 1000 мМ в течение 20 мин. Клетки бактерий культивировали на минимальной солевой среде вышеприведенного состава до стационарной фазы роста, центрифугировали 20 мин при 10500 g, отмывали однократно 0.01 М калий-фосфатным буфером, pH 7.2 \pm 0.2, центрифугировали повтор-

но и ресуспендировали в свежем 0.01 М калий-фосфатном буфере до концентрации клеток 0.3–0.4 мг/мл, раститровывали по 100 мкл в лунки круглодонного полимерного планшета (Медполимер, Россия) и вносили раствор акриламида до указанных концентраций. Контролем служили клетки без воздействия акриламида.

После 20-минутной экспозиции культуральный планшет центрифугировали 10 мин при 2464 g, удаляли надосадочную жидкость и разрушали клетки 90%-ным диметилсульфоксидом в течение 15 мин на льду, замораживали образец и хранили при –18°C. Для определения концентрации АТФ использовали стандартный набор реактивов АТФ Bioluminescent Assay Kit (Sigma, США), образцы разводили в 10 раз и измеряли интенсивность свечения на планшетном ридере Infinite M1000 pro (Tecan, Швейцария). Концентрацию АТФ определяли по калибровочному графику.

Нами не было установлено достоверного отличия от контроля содержания АТФ в клетках *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 4-1 после воздействия акриламида (рис. 1а, б), тогда как у *R. erythropolis* 6-21 и *A. faecalis* 2 (рис. 1в, г) снижение концентрации внутриклеточного АТФ было достоверным ($p < 0.05$). При этом не была обнаружена зависимость изменения содержания АТФ от концентрации акриламида.

Различное воздействие акриламида на энергетический статус изученных бактерий можно объяснить совокупностью свойств этих микроорганизмов, среди которых уровень активности нитрилгидролизующих ферментов и строение клеточной стенки. Так, наиболее активной нитрилгидратазой обладал штамм *R. ruber* gt1, при этом амидаза этого штамма была неактивна, в связи с чем штамм был устойчив к накоплению акриламида в среде как продукта трансформации акрилонитрила. Уровень амидазной активности *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2 был сопоставим, но виды отличались по грам-принадлежности. Грамположительные родококки более устойчивы к негативным воздействиям окружающей среды и обладают высоким биодegradативным потенциалом по отношению к широкому ряду токсичных соединений [10]. Однако активность амидазы *R. erythropolis* 6-21 была невысока, а нитрилгидратазная активность близка к нулю, в связи с чем штамм был чувствителен даже к низким концентрациям акриламида.

Влияние акриламида на свечение генноинженерного штамма *E. coli* K12 TG1 (pXen7) изучали при добавлении акриламида до конечной концентрации 10–1500 мМ к суспензии клеток. Люминесценцию регистрировали на универсальном микропланшетном ридере Infinite M1000 pro (Tecan, Швейцария) сразу после добавления акрила-

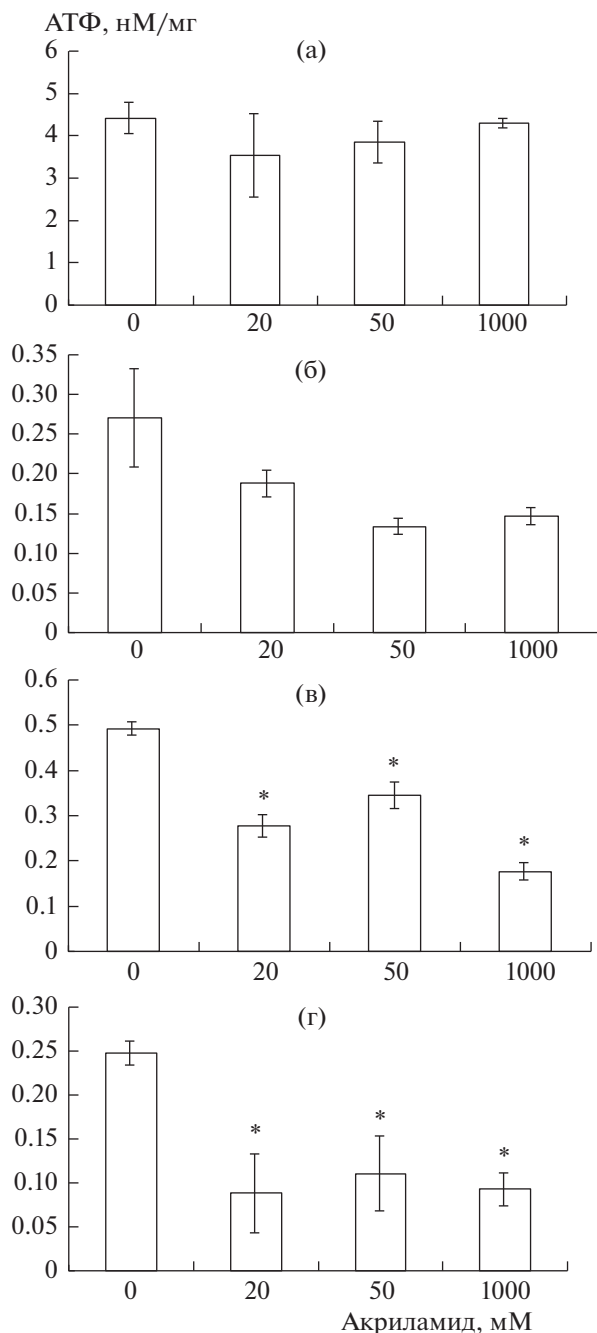


Рис. 1. Влияние акриламида на содержание АТФ в клетках *R. ruber* gt1 (а), *R. erythropolis* 4-1 (б), *R. erythropolis* 6-21 (в), *A. faecalis* 2 (г)

мида и через 10, 20, 30, 40, 50 и 120 мин экспозиции.

Известно, что свечение люминесцентных бактерий зависит от физиологического состояния клетки, а именно, от уровня НАДФН. Токсичные вещества, ингибируя электронтранспортную цепь, приводят к подавлению свечения этих микроорганизмов. Следовательно, токсичность об-

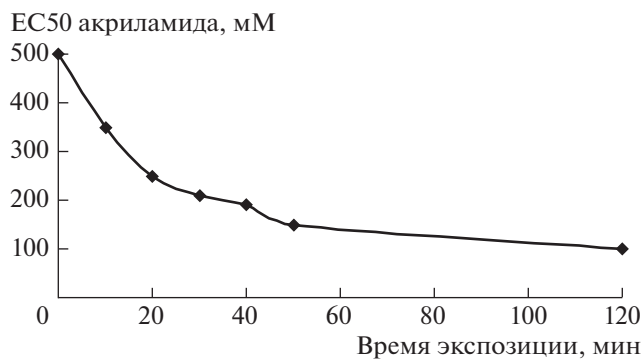


Рис. 2. Гашение свечения *E. coli* K12 TG1 (pXen7) на 50% (EC50) в зависимости от времени экспозиции с акриламидом.

разцов, содержащих ксенобиотики, тяжелые металлы и другие экотоксиканты, может быть оценена по степени тушения люминесценции [11]. В наших экспериментах гашение на 50% (EC50) свечения штамма *E. coli* K12 TG1 (pXen7) наблюдалось при концентрациях 500, 350, 250, 210, 190, 150 и 100 мМ акриламида за 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 120 мин соответственно (рис. 2). EC50 акриламида для этого штамма за 2 ч составляла 7108 мг/л, в то время как по отношению к дафниям и другим водным беспозвоночным EC50 акриламида составляет 98 мг/л при воздействии в течение 48 ч (паспорт безопасности акриламида, www.merck-millipore.com). Таким образом, токсический эффект акриламида проявляется, главным образом, по отношению к эукариотам, а не к прокариотам. Различие в его воздействии на бактериальные клетки и эукариотов может объясняться разными мишенями повреждающего действия этого токсического вещества. Так, у эукариотов этой мишенью в первую очередь является ДНК, что связано с трансформацией акриламида в более мутагенный глицидамид [12]. Есть сведения, что у животных и акриламид, и его метаболит глицидамид могут конъюгировать с глутатионом, благодаря активности глутатион-S-трансфераз, а затем трансформироваться в конъюгаты меркаптуровых кислот и выделяться с мочой. Конъюгация с глутатионом может приводить к снижению его доступности в клетке, что в свою очередь приводит к аккумуляции избыточного количества активных форм кислорода и окислительному стрессу [2]. Механизмы воздействия акриламида на прокариотов не исследованы.

Способность к росту бактерий родов *Rhodococcus*, *Alcaligenes* и *Escherichia* на полноценной питательной среде LB (Диаэм, Россия) при добавлении акриламида до конечных концентраций 10, 20, 50, 100, 250, 500 и 1000 мМ оценивали высевом на агаризованную питательную среду LB из се-

Таблица 1. Рост бактерий родов *Rhodococcus*, *Alcaligenes* и *Escherichia* (КОЕ/мл) в течение 7 суток на полноценной питательной среде LB, содержащей акриламид

мМ	Штаммы					
	<i>R. ruber</i> gt1	<i>R. erythro-</i> <i>poli</i> s 6-21	<i>R. erythro-</i> <i>poli</i> s 11-2	<i>A. faecalis</i> 2	<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> K12 TG1 (pXen7)
0	$(6.0 \pm 1.2) \cdot 10^7$	$(1.4 \pm 0.2) \cdot 10^8$	$(2.1 \pm 0.2) \cdot 10^8$	$(1.4 \pm 0.25) \cdot 10^9$	$(6.0 \pm 0.4) \cdot 10^8$	$(7.0 \pm 0.6) \cdot 10^8$
10	$(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(1.05 \pm 0.30) \cdot 10^8$	$(2.0 \pm 0.4) \cdot 10^8$	$(0.8 \pm 0.1) \cdot 10^9$	$(5.0 \pm 0.2) \cdot 10^8$	$(4.45 \pm 0.2) \cdot 10^8$
20	$(0.9 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(1.75 \pm 0.13) \cdot 10^8$	$(1.75 \pm 0.4) \cdot 10^8$	$(0.8 \pm 0.05) \cdot 10^9$	$(4.75 \pm 0.5) \cdot 10^8$	$(2.7 \pm 0.2) \cdot 10^8$
50	$(1.3 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(3.0 \pm 0.6) \cdot 10^7$	$(1.45 \pm 0.22) \cdot 10^7$	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^9$	$(7.0 \pm 1.0) \cdot 10^7$	$(1.8 \pm 0.3) \cdot 10^8$
100	$(1.15 \pm 0.40) \cdot 10^6$	$(1.25 \pm 0.22) \cdot 10^6$	$(5.0 \pm 1.3) \cdot 10^5$	$(0.5 \pm 0.2) \cdot 10^8$	$(3.2 \pm 0.4) \cdot 10^6$	$(3.85 \pm 0.15) \cdot 10^6$
250	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$(2.25 \pm 0.20) \cdot 10^4$	$(1.4 \pm 0.2) \cdot 10^5$	$(0.4 \pm 0.03) \cdot 10^6$	0	$(8.1 \pm 0.1) \cdot 10^5$
500	0	0	$(1.0 \pm 0.2) \cdot 10^4$	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0

рийных разведений и подсчетом количества колониеобразующих единиц. Среду LB (5 мл) с акриламидом инокулировали 100 мкл суспензии соответствующего штамма, содержащей 10^8 клеток в мл и культивировали при 30°C в течение 7 суток. Контролем служила среда LB без акриламида.

У большинства изученных штаммов нами было выявлено отсутствие роста с акриламидом в концентрации от 500 мМ и выше, за исключением *R. erythropolis* 11-2, количество КОЕ/мл которого при этой концентрации акриламида составляло $(1.0 \pm 0.2) \cdot 10^4$. Акриламид в концентрации 10–20 мМ приводил к незначительному снижению количества КОЕ по сравнению с контролем, а при концентрации 250 мМ сохранялось от 0.016 до 0.116% жизнеспособных бактериальных клеток (табл. 1).

Таким образом, рост изученных штаммов подавляют только очень высокие концентрации акриламида, что согласуется с результатами изучения воздействия этого вещества на энергетическое состояние бактериальных клеток. Полученные нами данные подтверждают, что оценка токсичности вещества, в данном случае акриламида, по отношению к эукариотам не всегда может быть сделана на основании токсичности по отношению к прокариотам.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят с.н.с. ИЭГМ УрО РАН, к.б.н. Масленникову И.Л. за предоставленный для работы штамм *E. coli* K12 TG1 (pXen7).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме “Молекулярные механизмы адаптации

микроорганизмов к факторам среды”, регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290009-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kusnin N., Syed M.A., Ahmad S.A. // JOBIMB. 2015. V. 3. № 2. P. 6–12.
2. Duda-Chodak A., Wajda Ł., Tarko T., Sroka P., Satora P. // FoodFunct. 2016. V. 7. № 3. P. 1282–1295.
3. Максимова Ю.Г., Васильев Д.М., Зорина А.С., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 2. С. 158–164.
4. Buranasilp K., Charoenpanich J. // J. Environ. Sci. 2011. V. 23. № 3. P. 396–403.
5. Jebasingh S.E.J., Lakshmikandan M., Rajesh R.P., Raja P. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2013. V. 85. P. 120–125.
6. Lakshmikandan M., Sivaraman K., Raja S.E., Vasanthakumar P., Rajesh R.P., Sowparthani K., Jebasingh S.E.J. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2014. V. 94. P. 214–221.
7. Shen S.-M., Wan T.-J., Hwang H.-Y. // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2012. V. 1. № 2. P. 110–114.
8. Wampler D.A., Ensign S.A. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 10. P. 5850–5857.
9. Rivas-Jimenez L., Ramirez-Ortiz K., González-Córdova A.F., Vallejo-Cordoba B., Garcia H.S., Hernandez-Mendoza A. // Microbiol. Res. 2016. V. 190. P. 19–26.
10. Соляникова И.П., Головлёва Л.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 132–139.
11. Куц В.В., Алена К.А., Сенько О.В., Ефременко Е.Н., Исмаилов А.Д. // Вода: химия и экология. 2011. № 10. С. 47–53.
12. Gökmen V. Acrylamide in food: analysis, content and potential health effects. Academic Press, 2015. 532 p.

INFLUENCE OF ACRYLAMIDE ON ENERGY STATUS AND SURVIVAL OF BACTERIA OF DIFFERENT SYSTEMATIC GROUPS

Yu. G. Maksimova^{a,b,#}, E. M. Mochalova^b, and Corresponding Member of the RAS V. A. Demakov^{a,b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural Branch, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

[#]e-mail: maks@iegm.ru; yul_max@mail.ru

We studied the effect of acrylamide on the content of intracellular ATP in the cells of bacteria of the genera *Rhodococcus* and *Alcaligenes*, the luminescence of the genetically engineered strain *Escherichia coli* K12 TG1 (pXen7), and the survival of bacteria of various systematic groups. According to the level of decrease in the concentration of intracellular ATP, it was found that the strain with lower amidase activity (*R. erythropolis* 6-21) and gram-negative proteobacteria *A. faecalis* 2 were the most sensitive to acrylamide after a 20-minute exposure, while the strain *R. ruber* gt 1 was stable, having high nitrile hydratase activity in combination with low amidase activity. EC50 of acrylamide for 2 hours was 7.1 g / L for *E. coli* K12 TG1 (pXen7). Acrylamide at a concentration of 10–20 mM added to the culture medium led to a slight decrease in the number of CFU of *Rhodococcus*, *A. faecalis* 2, and *E. coli* compared to the control. At an acrylamide concentration of 250 mM, from 0.016 to 0.116% of viable bacterial cells remained, and a solution of 500 mM and higher inhibited the growth of most of the studied strains. The results confirm that acrylamide is much less toxic to prokaryotes than to eukaryotes.

Keywords: Acrylamide, prokaryotes, toxicity, bioluminescence, amidase activity, ATP