

ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 57.084.1

НОВЫЕ ПОЛИКАТИОННЫЕ ПОЛИМЕРЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНИМИНА И РАСТИТЕЛЬНЫХ НАПОЛНИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2020 г. С. Г. Васильева^{1,*}, Е. С. Лобакова¹, А. С. Морозов¹, К. А. Шибзухова¹,
М. В. Титова², А. М. Носов²

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

*E-mail: vankat2009@mail.ru

Поступила в редакцию 01.05.2020 г.

После доработки 01.05.2020 г.

Принята к публикации 12.05.2020 г.

Изучена иммобилизация клеток микроводорослей на биосорбентах на основе полиэтиленimina и целлюлозосодержащих растительных компонентов. Поликатионные полимеры на основе полиэтиленimina обладают высоким сродством к поверхностным структурам микроводорослей и обеспечивают прочное прикрепление клеток к поверхности сорбента. Введение растительных наполнителей в состав таких полимеров способствует увеличению степени их биодegradации и снижению себестоимости. Для исследования были синтезированы шесть нерастворимых пористых полимерных материалов, полученных методом криополимеризации смеси полиэтиленimina и различных растительных компонентов с помощью диэтиленгликоль диглицидилового эфира. В качестве бионаполнителей использована лиофильно высушенная биомасса культур клеток растений *Ajuga turkestanica*, *Polyscias fruticosa*, а также клеточно-структурированный материал, полученный из их биомассы. Изучение кинетики и оценка эффективности иммобилизации клеток модельной культуры микроводоросли показали высокую сорбционную способность полученных материалов, так, через 24 ч культивирования эффективность иммобилизации составляла 72–77%. Оценка уровня фотосинтетической активности клеток микроводоросли методом импульсно-моделированной флуориметрии показала, что исследованные биосорбенты не оказывают какого-либо токсического действия на клетки и не влияют на их функциональную активность. Новые биосорбенты могут эффективно использоваться для сбора биомассы микроорганизмов из природных водных сред и промышленных культиваторов.

DOI: 10.1134/S1992722320010069

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время интенсивно развиваются биотехнологии на основе иммобилизованных культур оксигенных фототрофных микроорганизмов (ОФМ) — цианобактерий и микроводорослей (МВ) [1], с целью получения биомассы и ценных метаболитов (полиненасыщенных жирных кислот, витаминов, пигментов), очистки сточных вод от избытка биогенных элементов и тяжелых металлов, получения биоводорода, а также при создании биосенсоров [2]. Главное преимущество иммобилизованных клеток по сравнению с использованием клеточных суспензий — упрощение сбора биомассы, что является одной из ключевых проблем биотехнологии с участием МВ и цианобактерий. Иммобилизация также может способствовать повышению устойчи-

вости клеток ОФМ к действию неблагоприятных факторов (температура, кислотность, концентрация токсикантов), улучшению микроокружения клеток и их межклеточной коммуникации, увеличению градиента концентрации питательных веществ, что может приводить к увеличению метаболической активности клеток. В большинстве случаев иммобилизация позволяет добиться большей плотности клеток на единицу объема питательной среды в сравнении с культивированием суспензионных культур, а также уменьшить риск контаминации [3].

Технологии иммобилизации клеток ОФМ с использованием полимерных сорбентов могут также применяться для сбора биомассы в природных условиях при неконтролируемом их развитии, что позволит ликвидировать и/или не допус-

катель возникновения “цветения” водоемов. Известно, что массовое развитие ОФМ в открытых и закрытых водоемах приводит к их сильной токсификации, поскольку вторичные метаболиты цианобактерий и МВ являются чрезвычайно устойчивыми *in vivo* токсическими веществами [4, 5]. В последние годы “цветение” водоемов в связи с промышленной и сельскохозяйственной деятельностью приобрело глобальный характер, отмечены вспышки массового развития представителей ОФМ в пресных и морских водоемах не только традиционных регионов с теплым климатом, но и в районах Северной Европы, Северной Европейской части России и Сибири [6].

Основная сложность при использовании технологий с участием иммобилизованных культур заключается в выборе носителя. В качестве природных носителей для иммобилизации ОФМ часто используют субстраты из плодов люфы, сфагнум, торф, стекло, пластик, дерево, натуральные полисахариды (агар-агар, целлюлозу, альгинат, каррагинан, хитозан), в качестве синтетических носителей – полиакриламид, полиуретан, поливинилхлорид, полипропилен, полисульфон [2, 7].

Перспективным компонентом полимерных носителей может являться биомасса культур клеток высших растений или культур водных растений, например ряски, характеризующихся быстрым ростом, низким содержанием лигнина [8–10]. Культивируемые клетки высших растений являются объектами уже внедренных и разрабатываемых биотехнологий [11] и после получения из них целевого продукта (стероидов, алкалоидов, каротиноидов, витаминов и других ценных веществ) оставшиеся каркасы клеточных стенок могут быть использованы при создании биосорбентов [12].

Включение в состав синтетических полимерных сорбентов растительных наполнителей, обладающих развитой системой пор, позволяет значительно увеличить удельную площадь поверхности сорбентов и облегчить иммобилизацию микроорганизмов. Клетки микроорганизмов могут активно прикрепляться как к поверхности таких сорбентов, так и располагаться внутри них, заселяя пространство межклетников и полости клеток [9].

В настоящей работе исследованы сорбционная активность и биосовместимость полимерных материалов, полученных методом криополимеризации смеси полиэтиленimina (ПЭИ) и различных растительных компонентов. В качестве бионаполнителей была использована лиофильно высушенная биомасса суспензионных культур клеток растений *Ajuga turkestanica* или *Polyscias fruticosa*, а также клеточно-структурированный материал (КСМ), полученный из этих объектов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве полимерного компонента выбран материал на основе ПЭИ, полученный методом криополимеризации с диэтиленгликоль диглицидиловым эфиром (ДЭГ) и последующей дегидратации продукта по аналогии с методикой, описанной в [13]. В качестве бионаполнителей были отобраны следующие материалы: биомасса суспензионных культур клеток растений *A. turkestanica* и *P. fruticosa*, а также КСМ, полученный из биомассы этих культур клеток.

Культуры клеток высших растений живучки туркестанской *A. turkestanica* (Regel), Briq штамм At21, и полисциаса кустарникового *P. fruticosa* (L.), Harms штамм ба, депонированны во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ВККК ВР) под номерами 88 и 70 соответственно.

Культура клеток *A. turkestanica* получена из дикорастущего растения, произрастающего в горном районе Узбекистана, а культура клеток *P. fruticosa* – из корней растения, выращенного в теплице ИФР РАН.

Биомасса культур клеток для проведения исследований получена в результате выращивания суспензионных культур *A. turkestanica* и *P. fruticosa* в лабораторных барботажных биореакторах V-типа в УНУ ОБК ИФР РАН при температуре $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ на модифицированной питательной среде с минеральной основой по Мурасиге–Скуга [14] с добавлением источников углеводов, витаминов и регуляторов роста (в соответствии с коллекционным паспортом ВККК ВР). В зависимости от фазы ростового цикла расход воздуха на барботаж составлял 0.1–1.0 л/л/мин. Концентрацию растворенного кислорода в среде поддерживали на уровне 10–40% от насыщения. Биомассу собирали в конце ростового цикла (16–20-е сутки выращивания), клетки отделяли от среды фильтрованием под вакуумом, промывали водой и лиофилизировали. Краткая характеристика биогенных наполнителей представлена в табл. 1.

Клеточно-структурированный материал получали, помещая 5.0 г биомассы в 100 мл этилового спирта (95%), затем смесь кипятили в течение 2 ч и проводили декантирование спирта. Процедуру спиртовой обработки культуры клеток повторяли 5 раз, после чего полученный КСМ сушили при 70°C до постоянной массы.

Для получения биосорбентов 3.15 г 50%-ного раствора ПЭИ растворяли в 33 мл деионизованной воды, добавляли 2.51 г биогенного наполнителя и интенсивно перемешали на миншейкере. Затем к полученной массе добавляли 0.81 мл ДЭГ. Синтез сорбентов и последующую промывку вели по аналогии с методикой, описанной в [13].

Для определения насыпной плотности образцы сорбентов объемом 5–15 мл помещали в ци-

Таблица 1. Краткая характеристика биогенных наполнителей

Биогенный наполнитель	Химический состав
<i>A. turkestanica</i> лиофильно высушенная биомасса суспензионной культуры клеток	Крахмал, свободные аминокислоты, биогенные макро- и микро-элементы, редуцирующие сахара, ряд биологически активных веществ (в том числе фитостероиды)
КСМ из <i>A. turkestanica</i>	В основном целлюлоза и геммицеллюлоза
<i>P. fruticosa</i> (лиофильно высушенная биомасса суспензионной культуры клеток)	Крахмал, свободные аминокислоты, биогенные макро- и микро-элементы, редуцирующие сахара, ряд биологически активных веществ (в том числе тритерпеновые гликозиды – полисциозиды)
КСМ из <i>P. fruticosa</i>	В основном целлюлоза и геммицеллюлоза

линдр объемом 25 мл, измеряли объем и массу сорбента. Процесс повторяли до получения двух расходящихся не более чем на 10% значений. Для определения набухания навески сорбентов (15–50 мг) помещали в стеклянную колбу объемом 4.0 мл и прибавляли 3.0 мл буферных растворов одинаковой концентрации (0.1 М), но с разной кислотностью (рН 9 – фосфатный буферный раствор, рН 5 – ацетатный буферный раствор). Инкубирование сорбентов проводили при комнатной температуре в течение 1 ч. Набухание рассчитывали по формуле (1). Данные представлены в таблице как среднее из пяти измерений. Доверительные интервалы рассчитаны для доверительной вероятности $p = 0.90$.

$$S = \frac{m_w - m_d}{m_d}, \quad (1)$$

где S – набухание, m_w – масса набухшего сорбента, m_d – масса исходного сорбента.

Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии образцы исследуемых сорбентов массой 50–80 мг высушивали при температуре 60–80°C в течение 1 ч, а образцы сорбентов с иммобилизованными клетками МВ фиксировали 2%-ным раствором глутарового альдегида в 0.1 М какодилатном буфере (рН 7.2) в течение 1.5 ч. Далее процедуру обезвоживания, высушивания и напыление образцов проводили, как указано в [12].

Для исследования кинетики иммобилизации клеток МВ на сорбентах предварительно выращивали культуру *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 при постоянной температуре 25°C в фотобиореакторах закрытого типа в 0.6 л стеклянных колоннах диаметром 40 мм с 400 мл минеральной среды BG-11 [15]. Культивирование осуществляли при освещении белым светом интенсивностью 40 мкмоль квантов ФАР/м²/с до середины экспоненциальной фазы роста. Конечную плотность культуры определяли по содержанию хлорофилла (Хл), которое составляло 35–40 мг/л. По окончании культивирования (непосредственно перед экспериментом) суспензии клеток разводили в

4–6 раз стерильной водопроводной водой до концентрации хлорофилла 10–12 мг/л. Иммобилизацию клеток МВ на сорбентах проводили в стерильных пластиковых контейнерах для культивирования (“Eppendorf”) объемом 100 мл, содержащих навески сорбентов массой 450 мг и 50 мл суспензии клеток МВ. Колбы помещали в термостатированный шейкер (120 об./мин, 25°C) и инкубировали в течение 48 ч. Процесс иммобилизации контролировали по измерению содержания хлорофилла в суспензии, содержащей не прикрепившиеся к сорбенту клетки МВ. Отбор образцов осуществляли через 1, 3, 24 и 48 ч с начала иммобилизации, для чего отбирали 1 мл суспензии клеток и пропускали через сетчатый фильтр для удаления частиц сорбента. В качестве контроля использовали суспензию клеток без сорбентов.

Для определения содержания Хл 1.0 мл суспензии клеток центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 13400 об./мин на центрифуге Mini-Spin (“Eppendorf”, Германия); супернатант удаляли. Клетки инкубировали в диметилсульфоксиде при 70°C в течение 15 мин при интенсивном перемешивании на термошейкере TS-100С (“Bio-San”, Латвия). Процедуру экстракции повторяли дважды. Определение концентрации Хл *a* и Хл *b* в экстракте МВ проводили спектрофотометрически в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре Agilent Cary Bio 300 (“Agilent Technologies”, США). Расчет суммарной концентрации Хл для клеток МВ проводили с использованием уравнений [16]:

$$C_{Хл a} (\text{мг/л}) = 13.44D_{666} - 4.85D_{650}, \quad (2)$$

$$C_{Хл b} (\text{мг/л}) = 24.58D_{650} - 6.65D_{666}, \quad (3)$$

где $C_{Хл a}$, $C_{Хл b}$ – концентрации хлорофиллов *a* и *b* в экстракте соответственно, D_λ – оптическая плотность при соответствующей длине волны в нанометрах. Эффективность иммобилизации для сорбентов вычисляли по формуле

$$A = (C_{Хл1} - C_{Хл2}) \times 100\% / C_{Хл1}, \quad (4)$$

где A – эффективность иммобилизации культуры на сорбенте, %; $C_{Хл1}$ – содержание Хл в контроле,

Таблица 2. Насыпная плотность и набухание биосорбентов

Шифр	Насыпная плотность, г/мл	Набухание при pH 5	Набухание при pH 9
К-ДЭГ60	0.18	4.5 ± 0.1	4.2 ± 1.0
ПЭИ-Pf50	0.13	5.4 ± 0.3	5.9 ± 0.6
ПЭИ-Pf50-кc	0.12	8.1 ± 1.1	6.6 ± 1.3
ПЭИ-At50	0.13	7.8 ± 1.3	7.7 ± 1.1
ПЭИ-At50-кc	0.13	10.3 ± 1.1	9.4 ± 1.7
Pf	0.072		
At	0.088		

мг/л; $C_{Хл2}$ – остаточное содержание Хл в суспензии клеток при иммобилизации в течение времени t , мг/л.

Влияние сорбентов на жизнеспособность клеток МВ оценивали по фотосинтетической активности (ФСА) клеток, культивируемых в присутствии сорбентов. Для этого навески сорбентов массой 450 мг помещали в колбы объемом 100 мл, содержащие 50 мл суспензии клеток МВ (содержание Хл 10–12 мг/л). Колбы помещали в термостатированный шейкер (120 об./мин, 25°C) и инкубировали в течение 7 сут. Через 3, 24, 72 и 168 ч отбирали 30–40 мг сорбентов с прикрепленными клетками, выдерживали в темноте в течение 5 мин непосредственно перед каждым измерением флуоресценции хлорофилла. Для регистрации флуоресценции использовали стационарный импульсно-модулированный флуориметр Dual PAM-100 (“Heinz Walz GmbH”, Германия); облученность актиничного света – 11 и 865 мкмоль квантов ФАР/м²/с, измеряющего света – 500 мкмоль квантов ФАР/м²/с и насыщающей вспышки – 2000 мкмоль квантов ФАР/м²/с; канал возбуждения: 635–730 нм; канал детекции: 830–875 нм.

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. На графиках результаты представлены как средние значения ±s.d.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные в работе биосорбенты были получены путем криополимеризации смеси ПЭИ и растительного наполнителя в присутствии сшивающего агента – диэтиленгликоль диглицидилового эфира [17].

Для включения в состав биосорбента в качестве биологического компонента были выбраны лиофильно высушенная биомасса суспензионных культур клеток растений *A. turkestanica* (рис. 1а, 1б) и *P. fruticosa* (рис. 1в, 1г), состоящих преимущественно из меристематических и паренхимных клеток, объединенных в агрегаты.

Культура клеток *P. fruticosa* при выращивании формирует компактные агрегаты до 300 мкм в диаметре, содержащие 150–250 клеток. Клетки в агрегатах мелкие, меристематического типа без крупных вакуолей плотно прижаты друг к другу, отсутствуют межклеточные пространства (рис. 1в, 1г). Суспензионная культура *A. turkestanica* достаточно гетерогенна, в среде обнаруживаются клетки разного диаметра как собранные в рыхлые агрегаты, содержащие от 10 до 100 клеток, так и одиночные клетки (рис. 1а, 1б). Клеточно-структурированный материал из лиофильно высушенной биомассы суспензионных культур клеток *A. turkestanica* и *P. fruticosa* получен в результате экстракции из нее спиртом биологически активных веществ. Клеточно-структурированный материал сформирован частицами, содержащими агрегаты клеточных стенок (до 100 и более клеток), губчатую структуру и характеризуется широким диапазоном размеров и форм. В России культура клеток близкого вида полисициаса *Polyscias filicifolia* выращивается в биореакторах промышленного объема УНУ “Опытный биотехнологический комплекс” ИФР РАН (ОБК ИФР РАН), получаемая биомасса служит сырьем для производства нутрицевтика ВИТАГМАЛ компанией “BioPharmos Group” г. Санкт-Петербург (<https://bioconstructor.ru/>). Отходом этого производства является КСМ после экстракции из биомассы целевых метаболитов.

В результате введения в ПЭИ растительных наполнителей были получены биосорбенты ПЭИ-At50 и ПЭИ-Pf50 на основе биомассы суспензионных культур клеток *A. turkestanica*, *P. fruticosa* соответственно и биосорбенты ПЭИ-At50-кc, ПЭИ-Pf50-кc на основе КСМ из *A. turkestanica*, *P. fruticosa*. Доля растительного наполнителя в составе полученных биосорбентов составляла 50%.

Проведено сравнение характеристик полученных биосорбентов и сорбента К-ДЭГ60, не содержащего растительных наполнителей. Исследованный ранее полимер К-ДЭГ-60 показал хорошие сорбционные свойства в отношении клеток ОФМ, а также отсутствие токсического эффекта на клетки гетеротрофных [18] и фототрофных микроорганизмов [13].

Полученные биосорбенты представляют собой гранулы неправильной формы размером от 0.5 до 1.5 см (табл. 2). Их насыпная плотность несколько меньше, чем у сорбента без наполнителя ПЭИ-ДЭГ60, что объясняется очень низкой насыпной плотностью использованных растительных наполнителей. Все сорбенты не имеют запаха и несколько менее гигроскопичны по сравнению с материалом ПЭИ-ДЭГ60 (определяли по изменению массы при стоянии на воздухе в течение одних суток).

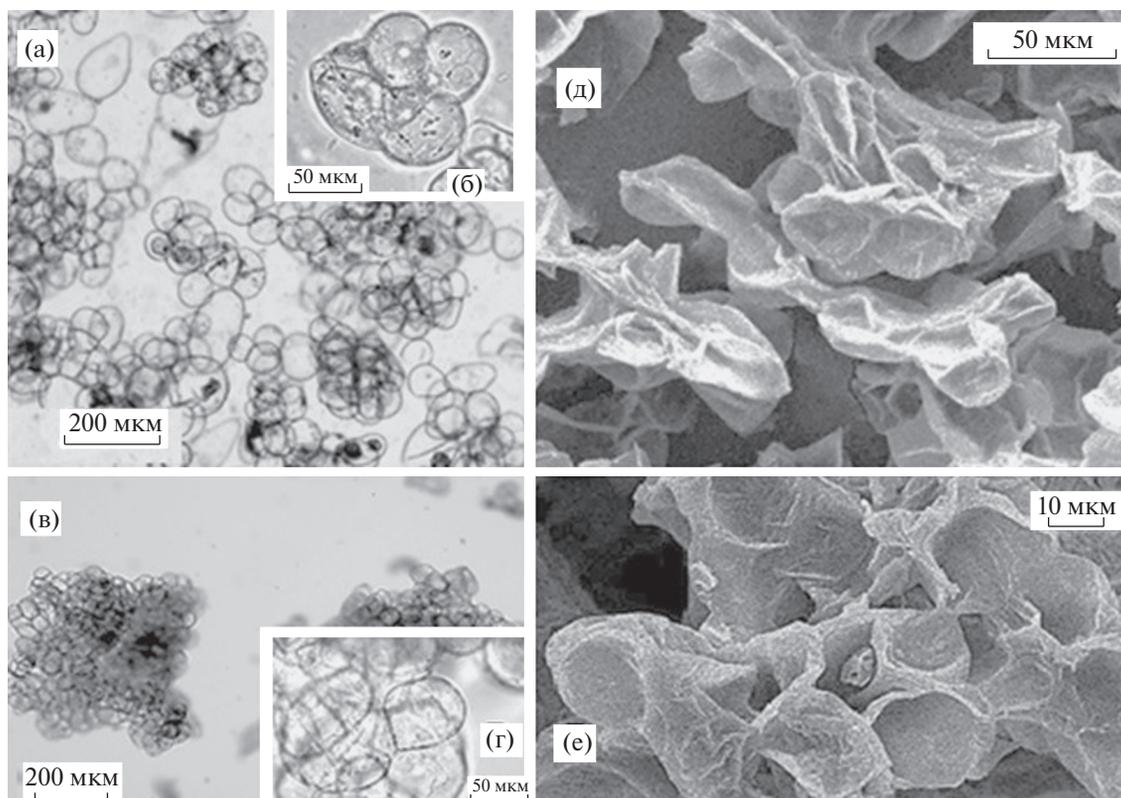


Рис. 1. Морфоструктурные особенности суспензионных культур клеток *A. turkestanica* (а, б) и *P. fruticosa* (в, г) и их лиофильно высушенной биомассы (д, е) соответственно.

Образцы биосорбентов заметно набухают в водных растворах. Для определения набухания образцы погружали в два буферных раствора одинаковой концентрации (0.1 М), но с разной кислотностью (рН 9 – фосфатный буферный раствор, рН 5 – ацетатный буферный раствор) (табл. 2). В большинстве случаев композиционные материалы сильнее набухают в кислом растворе, что, по-видимому, объясняется протонированием полиэтилениминной матрицы и последующим “расталкиванием” положительно заряженных полимерных цепей. Биосорбент, где в качестве наполнителя выступает биомасса *P. fruticosa*, являются исключением, что, возможно, связано с особенностями синтезируемых данной культурой вторичных метаболитов. В большинстве случаев введение растительного сырья в полимерный материал приводит к увеличению набухания. Другим интересным фактом является увеличение набухания биосорбентов при введении в состав КСМ, полученных при отмывке биомассы культур этиловым спиртом, что приводит к получению практически чистых клеточных стенок наполнителей, состоящих преимущественно из целлюлозы и гемицеллюлозы [19]. Подобная закономерность, по-видимому, обусловлена нали-

чием пустот внутри клеток, недоступных для ПЭИ, но доступных для молекул воды.

По данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) лиофильно высушенная биомасса суспензионной культуры клеток *P. fruticosa* представлена губчато-ячеистой массой. В основном биомасса сформирована плотными агрегатами, состоящими из 30–50 округлых паренхимных клеток диаметром до 40 мкм. Клетки в агрегатах располагаются хаотично, плотно прижаты друг к другу, вследствие чего полости между клетками практически не выявляются. Поверхность клеточных структур слабо морщинистая (рис. 1е).

Биомасса *A. turkestanica* (рис. 1д) представлена рыхлой губчато-ячеистой массой клеточных агрегатов, состоящих преимущественно из паренхимных клеток диаметром до 50 мкм. Между клетками и агрегатами клеток выявляются многочисленные полости. Поверхность клеток мелкоморщинистая.

По данным СЭМ полученные биосорбенты и полимер К-ДЭГ60 представляют собой полимерные материалы с развитой складчато-пористой рваной поверхностью. На поверхности гранул выявляются поры, каналы и бороздки разной конфигурации, формирование которых происходит при кристаллизации смеси ПЭИ и ДЭГ вокруг микрокристаллов льда (рис. 2а).

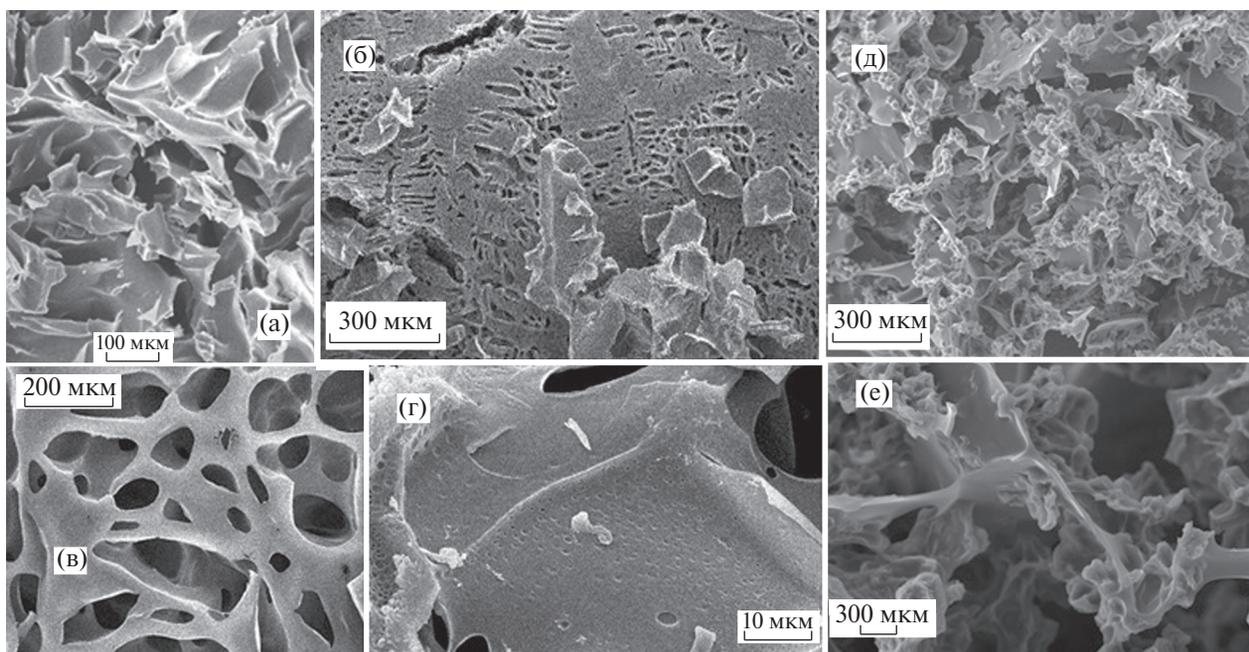


Рис. 2. Фрагменты поверхности гранул сорбента К-ДЭГ60 (а), биосорбентов ПЭИ-Pf50 (б, в), ПЭИ-At50 (г) и ПЭИ-Pf50-кс (д, е).

Введение в состав сорбентов на основе ПЭИ материала в виде биомассы растительных клеток существенно изменяет его поверхностную структуру (рис. 2б). Поверхность биосорбентов, содержащих 50% биомассы культуры клеток *P. fruticosa* и *A. turkestanica*, характеризовалась наличием отверстий и пор в виде сплюснутых овалов диаметром 15–20 мкм и длиной от 30 до 150 мкм. На рис. 3б, 3в видно, что внутренняя часть биосорбентов имеет разветвленную систему каналов разного диаметра.

Отличием биосорбента, полученного на основе культуры клеток *A. turkestanica*, является наличие на поверхности округлых вдавлений диаметром от 500 до 700 нм (рис. 3г).

Наиболее интересными являются структурные особенности биосорбентов, полученных при добавлении в полиэтиленимин КСМ биомассы суспензионных культур клеток *P. fruticosa* (рис. 2д, 2е) и *A. turkestanica*. Введение КСМ при синтезе сорбентов приводит к формированию крупноячеистых сетчатых материалов ПЭИ-At50кс и ПЭИ-Pf50кс, схожих по характеру поверхностных и внутренних структур. Средний размер ячеек составляет 150 мкм. Поверхность стенок ячеек не ровная, бугристо-ямчатая. На некоторых участках находятся структуры, которые по форме и размерам соответствуют клеткам растений *A. turkestanica* и *P. fruticosa*.

Результаты исследований кинетики иммобилизации клеток зеленой МВ *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 на синтезированных биосорбентах пред-

ставлены на рис. 3а, 3в. В течение первых трех часов культивирования наибольшее количество клеток МВ прикреплялось к поверхности сорбента К-ДЭГ60 (рис. 3а), в то время как количество клеток МВ, иммобилизованных на биосорбентах ПЭИ-At50 и ПЭИ-Pf50, содержащих биомассу культуры клеток *A. turkestanica* и *P. fruticosa*, было в 2.5–3 раза ниже. Однако в течение 24 ч культивирования скорость и полнота прикрепления клеток *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 к сорбенту К-ДЭГ60 значительно снижались по сравнению с биосорбентами ПЭИ-At50 и ПЭИ-Pf50, и к окончанию эксперимента количество иммобилизованных клеток на всех сорбентах было практически одинаковым.

На рис. 3б представлены значения рассчитанной по формуле (4) эффективности иммобилизации клеток МВ *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 на сорбентах. При культивировании МВ в присутствии сорбента К-ДЭГ60 около 59–61% клеток переходило в иммобилизованное состояние в течение трех часов (рис. 3б). Высокая сорбционная способность поликатионного сорбента К-ДЭГ60 на основе ПЭИ связана с его высоким сродством с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеток МВ. Полисахариды, белки и полипептиды, входящие в состав поверхностных структур клеток МВ, имеют отрицательно заряженные группы (как правило, карбоксильные) и могут взаимодействовать с положительно заряженными аминокеттогруппами, расположенными на поверхности сорбентов.

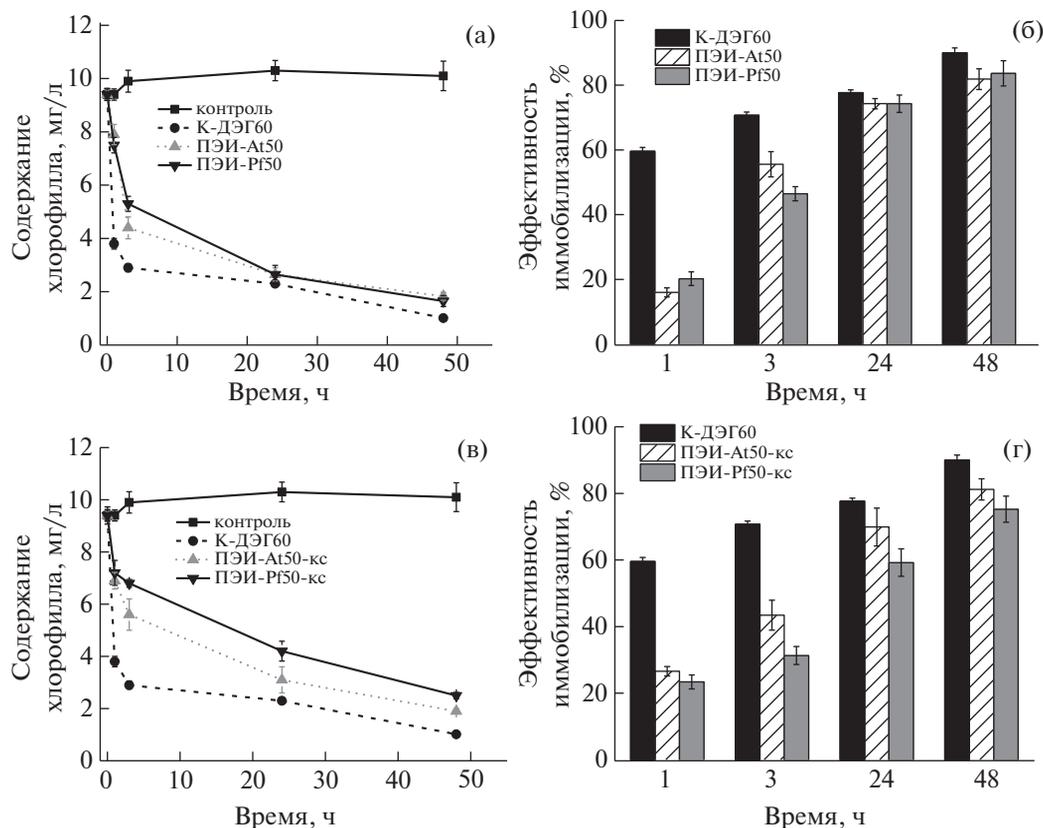


Рис. 3. Кинетика (а, в) и эффективность (б, г) иммобилизации клеток *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 на биосорбентах, содержащих культуру клеток (а, б) и клеточно-структурированный материал (в, г) растений *A. turkestanika* и *P. fruticosa* в сравнении с клетками МВ, культивируемыми с сорбентом К-ДЭГ60. Контролем служила культура МВ, культивируемая в отсутствие сорбентов.

Эффективность иммобилизации сорбентов ПЭИ-At50 и ПЭИ-Pf50 в течение трех часов была значительно ниже и составляла 18–21%. Более низкая сорбционная активность биосорбентов, по-видимому, объясняется уменьшением поверхностного заряда полимеров ПЭИ-At50 и ПЭИ-Pf50 в сравнении с К-ДЭГ60, вызванного введением в состав растительных наполнителей. В течение 48 ч культивирования процесс иммобилизации на сорбенте К-ДЭГ60 существенно замедлялся, возможно, из-за уменьшения количества доступных сайтов связывания с клетками МВ. В этот же период скорость прикрепления клеток к поверхности биосорбентов ПЭИ-At50 и ПЭИ-Pf50 была выше, чем для К-ДЭГ60, что может объясняться большей площадью их поверхности, доступной для адсорбционного прикрепления клеток МВ.

Как видно из рис. 3в, описывающего кинетику иммобилизации клеток *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 на биосорбентах, содержащих КСМ растительных материалов, в течение одного часа иммобилизации клетки с одинаковой полнотой и скоростью прикреплялись к поверхности сорбентов ПЭИ-At-50кc, ПЭИ-Pf-50кc, при этом сорбци-

онная активность указанных носителей была значительно ниже, чем К-ДЭГ60. Однако в период от 3 до 24 ч инкубации скорость прикрепления клеток к биосорбентам, содержащим КСМ, была выше, чем для К-ДЭГ60. Схожая тенденция была отмечена ранее для полимеров ПЭИ-At50 и ПЭИ-Pf50, содержащих культуру клеток растений.

По-видимому, основными типами взаимодействия клеток МВ и изученных полимеров на основе ПЭИ и растительных наполнителей являются электростатическое и адсорбционное взаимодействие. Скорость электростатического взаимодействия значительно превышает скорость адсорбционного [20], поэтому в течение первых часов иммобилизации наибольшее количество клеток прикрепляется к носителю К-ДЭГ60, имеющему наибольшее количество заряженных аминогрупп, доступных для связывания с отрицательно заряженными карбоксильными группами соединений, входящих в состав поверхностных структур МВ. После быстрого этапа сорбции клеток по мере исчерпания количества доступных аминогрупп на поверхности К-ДЭГ60 скорость иммобилизации начинает снижаться, при этом клетки

начинают более активно прикрепляться к незаряженным поверхностям полимера благодаря адсорбционному механизму взаимодействия. В этот период скорость прикрепления клеток МВ к поверхности сорбентов, содержащих биомассу культуры клеток растений и КСМ, значительно выше по сравнению с К-ДЭГ60, что можно объяснить большей площадью их поверхности из-за введения в состав ячеистых и пористых растительных компонентов. Одиночные клетки или агрегаты клеток МВ могут заселять многочисленные поры в составе растительных наполнителей и таким образом надежно удерживаться на их поверхности.

Как видно из рис. 3б, 3г, эффективность иммобилизации сорбентов, содержащих биомассу культуры клеток и КСМ *A. turkestanika*, практически не различалась. В случае *P. fruticosa* композитные материалы с добавлением культуры клеток были более эффективны по сравнению с КСМ этого растительного наполнителя, при этом эффективность иммобилизации клеток МВ для ПЭИ-Pf-50 и ПЭИ-Pf-50-кс через 24 ч культивирования составила 75 и 59% соответственно.

Сравнение эффективности иммобилизации клеток МВ на биосорбентах, содержащих КСМ и культуры клеток *A. turkestanika* и *P. fruticosa*, показало, что в течение 24 ч культивирования сорбционная активность сорбентов ПЭИ-Pf-50, ПЭИ-At-50 и ПЭИ-At50кс (рис. 3б, 3г) практически не различалась и составляла 70–75%, в то время как к сорбенту ПЭИ-Pf50кс прикреплялось в среднем около 58% клеток.

Известно, что в стенках культивируемых растительных клеток встречаются три типа ионообменных групп: карбоксильные группы полигалактуроновой и гидрооксикоричной кислот и первичные аминогруппы. Карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты являются наиболее представленными, их доля составляет от 11.5% для культур *Dioscorea deltoides* и *Pana japonicus* и до 13.4% в клеточных стенках культур рода *Polyscias filicifolia* [19]. Можно предположить, что более низкая сорбционная активность сорбента ПЭИ-Pf50кс связана с наличием в составе КСМ большого количества свободных карбоксильных групп, взаимодействии которых с аминогруппами ПЭИ может приводить к частичной нейтрализации поверхностного заряда полимеров и снижению их электростатического взаимодействия с клетками МВ.

Таким образом, изучение кинетики и оценка эффективности иммобилизации клеток *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 показали, что биосорбенты с добавлением биомассы суспензионных культур клеток *A. turkestanika* и *P. fruticosa*, а также полимеры, содержащие КСМ, полученный из этих куль-

тур, иммобилизуют около 75–84% клеток в течение 48 ч культивирования.

На следующем этапе была проведена оценка влияния синтезированных сорбентов на жизнеспособность клеток *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047, с этой целью применяли метод импульсно-моделированной флуориметрии, с помощью которого оценивали уровень ФСА клеток. Измерение флуоресценции $Xl a$ — один из самых популярных неинвазивных методов анализа ФСА, основой которого является то, что хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным индикатором состояния клеток [21].

Известно, что фотосинтез иммобилизованных клеток может меняться из-за изменения условий освещенности по сравнению со свободными клетками [2], недостатка CO_2 , а также наличия токсичных веществ в составе сорбентов, влияющих на метаболическую активность клеток [3].

Как видно из рис. 4а, значения F_v/F_m , определяющие величину фотохимического квантового выхода ФСП, для *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047, культивируемой без сорбентов, относительно высоки и составляли приблизительно 0.65–0.67 на протяжении всего семидневного эксперимента. В течение трех часов культивирования для клеток, иммобилизованных на сорбентах ПЭИ-At50 и ПЭИ-Pf50, наблюдалось незначительное снижение ФСА, не более 10% от контроля. Через 48 ч значения квантового выхода ФСП для клеток, иммобилизованных на указанных сорбентах, восстанавливались до первоначальных значений. Незначительное ингибирующее действие сорбентов, наблюдаемое на начальном этапе культивирования их с клетками обеих исследованных культур, может быть связано с наличием в клеточной биомассе вторичных метаболитов (табл. 1) и их влиянием на иммобилизацию и эффективность флуоресценции клеток МВ.

Следует отметить, что в [13] было исследовано влияние сорбента К-ДЭГ60 на ФСА иммобилизованных клеток и биолюминесценцию фотобактерий [18], и показано отсутствие токсичности для гетеротрофных бактерий, Цб и МВ.

В течение трех часов культивирования клеток *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 в присутствии биосорбентов, содержащих КСМ *P. fruticosa* и *A. turkestanika* (рис. 4б), наблюдалось снижение F_v/F_m до значений 0.48–0.53, однако после 24 ч культивирования значения квантового выхода ФСП увеличивались до 0.58–0.63. Последующее инкубирование клеток в присутствии сорбента, содержащего КСМ *P. fruticosa*, сопровождалось незначительным падением выходов фотохимической утилизации энергии, при этом для клеток *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047, иммобилизованных на ПЭИ-At50-кс, ингибирования не наблюдалось.

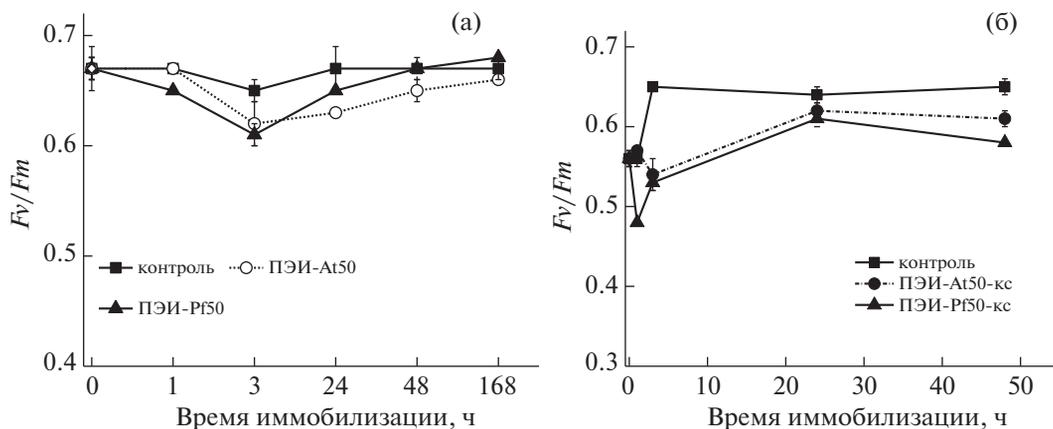


Рис. 4. Оценка фотосинтетической активности клеток *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047, культивируемой в присутствии биосорбентов, содержащих культуры клеток (а) и клеточно-структурированный материал (б), в сравнении с клетками МВ, культивируемых в отсутствие сорбентов.

Следует отметить, что при культивировании клеток *Lobosphaera CALU925* в течение семи суток в присутствии всех сорбентов не наблюдали снижения ФСА клеток по сравнению с контролем.

Таким образом, на основании проведенного эксперимента можно сделать вывод, что исследованные биосорбенты не оказывали негативного влияния на функционирование фотосинтетического аппарата клеток модельных культур МВ, а значит, не содержали токсичных для них соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полимерные сорбенты на основе полиэтилена могут быть использованы для быстрого и эффективного сбора биомассы микроорганизмов из природных водных сред и промышленных культиваторов. Включение в состав синтетических полимерных сорбентов биологических растительных наполнителей, обладающих развитой системой пор и с шероховатой внешней поверхностью, позволяет значительно увеличить удельную площадь поверхности сорбентов и облегчить иммобилизацию микроорганизмов. Клетки микроорганизмов могут активно заселять как поверхность сорбентов, так и располагаться внутри них, заселяя полости межклеточных пространств и клеток. По сравнению с биомассой интактных растений в процессе приготовления клеточно-структурированного материала происходит формирование мелких повреждений поверхности, которые могут являться дополнительными элементами заселения клетками микроорганизмов структур КСМ и созданных сорбентов. Следует добавить, что использованные в работе растительные материалы являются объектами уже внедренных и разрабатываемых биотехнологий и после получения из них целевого продукта (сте-

роидов, алкалоидов, каротиноидов и других ценных веществ) оставшиеся компоненты могут быть использованы при создании биосорбентов. Данные, полученные с помощью элементного и функционального анализов, показали, что стенки культивируемых клеток растений характеризуются высоким содержанием пектинов (~40 мас. %) и структурных белков (~17–30 мас. %) и не содержат фенольных ОН-групп, характерных для лигнина [19], т.е. лиофильно высушенная биомасса культур клеток растений *A. turkestanica* и *P. fruticosa*, а также КСМ, полученный из этих объектов, не содержат труднодеградируемого природного полимера лигнина.

Изучение кинетики и эффективности иммобилизации клеток окислительных фототрофных микроорганизмов на биосорбентах показало, что на начальном этапе иммобилизации они с меньшей скоростью и полнотой сорбируют клетки в сравнении с синтетическим полимером К-ДЭГ60, однако в течение суток эффективность биосорбентов и К-ДЭГ-60 практически не различается. Оценка уровня фотосинтетической активности клеток МВ методом импульсно-моделированной флуориметрии показала, что исследованные биосорбенты не оказывают какого-либо токсического действия на клетки и не влияют на их функциональную активность в течение продолжительного инкубирования, поэтому они могут использоваться не только для быстрой сорбции клеток, но и для длительного культивирования иммобилизованных клеток в биореакторах.

Работа выполнена на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» при финансовой поддержке Правитель-

ства Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1882).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T.* // *J. Ind. Microbiol.* 1996. V. 16 (2). P. 79.
2. *Moreno-Garrido I.* // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. P. 3949.
3. *De-Bashan L.E., Bashan Y.* // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101 (6). P. 1611.
4. *Apeldoorn M.E., Egmond H.P., Speijers G.J.A. et al.* // *Molecular Nutrition Food Research.* 2007. V. 51. P. 7.
5. *Pearson L., Mihali T., Moffitt M. et al.* // *Marine Drugs.* 2010. V. 8. P. 1650.
6. *Davis T.W., Berry D.L., Boyer G.L. et al.* // *Harmful Algae.* 2009. V. 8. P. 715.
7. *Hameed M.S.A., Ebrahim O.H.* // *J. Agric. Biol.* 2007. V. 9 (1). P. 183.
8. *Ehwald R., Woehlecke H., Titel K.* // *Photochemistry.* 1992. V. 33. P. 3033.
9. *Baulina O.I., Ehwald R., Gorelova O.A. et al.* // *Microbiology.* 1995. V. 64(4). P. 440.
10. *Lobakova E., Vasilieva S., Kashcheeva P. et al.* // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2016. V. 108. P. 99.
11. *Носов А.М.* // *Биотехнология.* 2010. Т. 5. С. 8.
12. *Ivanova E.A., Lobakova E.S., Idiatulov R.K. et al.* // *Pet. Chem.* 2019. V. 59. P. 420.
13. *Vasilieva S., Shibzukhova K., Morozov A. et al.* // *J. Biotechnol.* 2018. V. 281. P. 31.
14. *Murashige T., Skoog F.* // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473.
15. *Stanier R., Kunisawa R., Mandel M. et al.* // *Bacteriol Rev.* 1971. V. 35 (2). P. 171.
16. *Solovchenko A., Merzlyak M.N., Khozin-Goldberg I. et al.* // *J. Phycology.* 2010. V. 46. P. 763.
17. *Nuzhdina A.V., Morozov A.S., Kopitsyna M.N. et al.* // *Mater. Sci. Eng. C* 2017. V. 1(70). P. 788.
18. *Орлова А.А., Алескерова Л.Э., Васильева С.Г. и др.* // *Биотехнология.* 2020. № 3. (В печати).
19. *Мейчик Н., Николаева Я., Кущунина М. et al.* // *Plant Cell Tissue Organ. Culture.* 2017. V. 129. P. 493.
20. *Синицын А., Райнина Е., Лозинский В., Спасов С.* Иммуобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1994. 288 с.
21. *Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Ризниченко Г.Ю. и др.* // *Биофизика.* 2015. Т. 60. № 3. С. 487.