

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 57.589

СБОР БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ СОРБЕНТОВ
НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНИМИНА

С.Г. Васильева*, К.А. Шибзухова, А.С. Морозов, Е.С. Лобакова

Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*email: vankat2009@mail.ru

Целью настоящей работы стала оценка возможности использования сорбентов на основе полиэтиленимина (ПЭИ) для эффективного сбора биомассы микроводорослей (МВ). Серия пористых и нерастворимых полимерных материалов была получена путем сшивания ПЭИ эпихлоргидрином. Изучение кинетики и оценка эффективности иммобилизации клеток модельной культуры *Chlorella vulgaris* на сорбентах показали, что уже в течение 3 ч к поверхности сорбентов прикрепляется в среднем 39–75% клеток, при этом на начальном этапе иммобилизации сорбирующая активность полимерных материалов зависит от соотношения ПЭИ и сшивающего агента. Дополнительная кварternизация одного из сорбентов путем алкилирования диметилсульфатом приводила к резкому увеличению его сорбирующей активности в отношении клеток модельной культуры МВ. Изучение процесса десорбции показало, что клетки МВ *Ch. vulgaris* практически необратимо иммобилизуются на поверхности всех изученных сорбентов на основе сшитого эпихлоргидрином ПЭИ.

Ключевые слова: микроводоросли, иммобилизация, сорбенты, сшитые полиэтиленимины, сбор биомассы, полимерные материалы

В настоящее время спрос на биомассу микроводорослей (МВ), а также продукты на их основе неуклонно растет. Применяемые методы сбора МВ дорогостоящи, энергозатратны и трудоемки [1] и определяют в среднем на 20–30% себестоимость биомассы. С другой стороны, зарегистрированные в различных водоемах явления массового развития фототрофных микроорганизмов, в том числе МВ, создают целый ряд проблем. Ежегодно фиксируется около 150 тыс. случаев отравления людей рыбой или другими продуктами, содержащими токсины фототрофных микроорганизмов [2]. Таким образом, поиск новых сорбентов, позволяющих эффективно собирать биомассу как токсичных, так и биотехнологически значимых культур МВ, является актуальной задачей.

Мы предположили, что пористые сорбенты на основе полиэтиленимина (ПЭИ) благодаря содержанию многочисленных аминогрупп на поверхности [3] будут обладать высоким сродством к поверхностным структурам МВ и таким образом обеспечивать их быстрое и устойчивое прикрепление.

Целью настоящей работы стали синтез сорбентов на основе ПЭИ, обеспечивающих высокую скорость и полноту сбора биомассы МВ, а также исследование структуры поверхности и сорбционной активности таких сорбентов в отношении модельной культуры МВ.

Материалы и методы

Объект исследования. В качестве модельной была выбрана культура *Chlorella vulgaris* (IPPAS S-2014), культивирование которой проводили по методике, описанной ранее [4].

Получение сорбентов. Сшивку сорбентов на основе ПЭИ проводили при нагревании, используя эпихлоргидрин в различных массовых концентрациях (7,5%; 15%; 30%), далее проводили дегидратацию продукта по аналогии с методикой, описанной в работе Нуждиной и соавт. [5]. При этом были получены пористые нерастворимые сорбенты П-Э30, П-Э15, П-Э7,5 с различным соотношением основных компонентов “ПЭИ:эпихлоргидрин”. Сорбент П-Э30 был дополнительно алкилирован диметилсульфатом, как описано ранее [5], для создания полимера П-КЭ30, содержащего четвертичные аммонийные группы на поверхности.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Для исследования поверхности сорбентов и особенностей прикрепления клеток МВ образцы полимерных материалов готовили, как описано в работе Лобаковой и соавт. [4].

Изучение кинетики и оценка эффективности иммобилизации клеток МВ на сорбентах. Изучение кинетики иммобилизации клеток и определение остаточного содержания хлорофилла (Хл) проводили по методике, описанной ранее [4]. Эффективность иммобилизации ($\Theta_{\text{им}}$) клеток МВ на сорбентах определялась по формуле:

$$\Theta_{\text{им}} = (\text{СХл}_1 - \text{СХл}_2) \cdot 100\% / \text{СХл}_1,$$

где $\Theta_{\text{им}}$ — эффективность иммобилизации культуры на сорбенте (%); СХл_1 — содержание Хл в контроле (мг/л); СХл_2 — остаточное содержание Хл в суспензии клеток при иммобилизации в течение определенного интервала времени (мг/л).

Изучение десорбции клеток. Для изучения процесса десорбции образцы полимерных материалов с иммобилизованными клетками погружали в колбы объемом 50 мл, содержащие по 20 мл 0,5 М NaOH или 20%-ного раствора NaCl. Затем колбы помещали в термостатируемый шейкер Innova-44 (New Brunswick, США) и инкубировали в течение 24 ч при 120 об./мин и температуре 25°C. Процесс десорбции контролировали по изменению содержания хлорофилла в суспензии, содержащей открепившиеся от сорбента клетки МВ. Отбор образцов осуществляли через 1, 3 и 24 ч от начала инкубации, для чего отбирали 1 мл суспензии клеток и определяли содержание в ней хлорофилла.

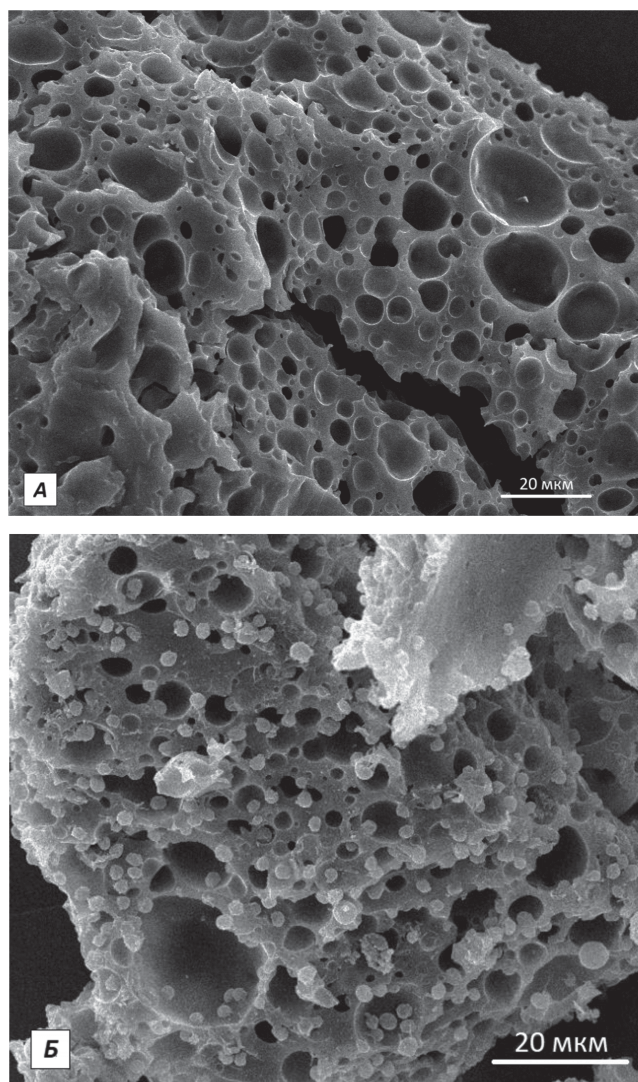


Рис. 1. Микрофотографии поверхности сорбентов и иммобилизованных клеток *Ch. vulgaris*. А — сорбент П-Э30, Б — клетки *Ch. vulgaris*, иммобилизованные на сорбенте П-Э15

Результаты и обсуждение

В настоящее время для получения материалов на основе химически сшитого ПЭИ используют различные сшивающие агенты, в частности, хлорангидрид себациновой кислоты, терефталевый альдегид, эпихлоргидрин, 1,5-дибромпентан [5–7], позволяющие получать твердые полимерные материалы, обладающие разнообразными физико-химическими свойствами и отличающиеся формой и характером поверхности.

Исследование поверхности сорбентов, проведенное методом СЭМ, показало, что все синтезируемые сорбенты представляют собой частицы несимметричной формы размером от 0,5 до 1,5 см. Они характеризуются наличием макропор диаметром от 2 до 40 мкм (рис. 1, А), при этом их количество зависит от соотношения “ПЭИ:эпихлоргидрин” в составе сорбента. Наибольшая степень пористости характерна для полимера П-Э30 (массовое содержание эпихлоргидрина 30%), обладающего однородной пористой поверхностью. По мере уменьшения количества сшивающего агента количество пор на поверхности сорбентов уменьшается — так, на поверхности сорбента П-Э7,5 (массовое содержание эпихлоргидрина 7,5%) наблюдается чередование участков с гладкой и пористой поверхностью.

Исследование поверхности сорбентов после их инкубации с клетками *Ch. vulgaris* показало, что клетки МВ уже через 3 ч инкубации заселяют значительное количество пор и межпористое пространство на поверхности полимеров (рис. 1, Б). Через 24 ч наблюдается образование однородного монослоя клеток на поверхности всех синтезируемых сорбентов. Известно, что полисахариды, белки и полипептиды, входящие в состав поверхностных структур клеток МВ и имеющие отрицательно заряженные группы (как правило, карбоксильные), эффективно взаимодействуют с поверхностью поликатионных полимеров на основе ПЭИ. Следует добавить, что в водных растворах ПЭИ обладают склонностью к образованию многочисленных межмолекулярных водородных связей, за счет чего прочность связывания ПЭИ с клеточными стенками МВ может увеличиваться [3].

Исследование кинетики иммобилизации клеток МВ на синтезированных полимерных материалах показало, что наиболее эффективным следует считать квартизированный сорбент П-КЭ30 — так, уже в течение 1 ч инкубации содержание неприкрепленных к сорбенту клеток МВ (определенное по остаточному содержанию Хл в среде) снижалось почти в четыре раза по сравнению с его начальной концентрацией в суспензии (рис. 2, А), при этом рассчитанная $\Theta_{\text{им}}$ для сорбента П-КЭ30 составляла 76,4% (рис. 2, Б). Остальные сорбенты со значительно меньшей скоростью сорбировали клетки на начальной стадии процесса иммобилизации — так, например, через 3 ч $\Theta_{\text{им}}$ для сорбентов П-Э30, П-Э15 и П-Э7,5 не превышала 58,2%, в то время

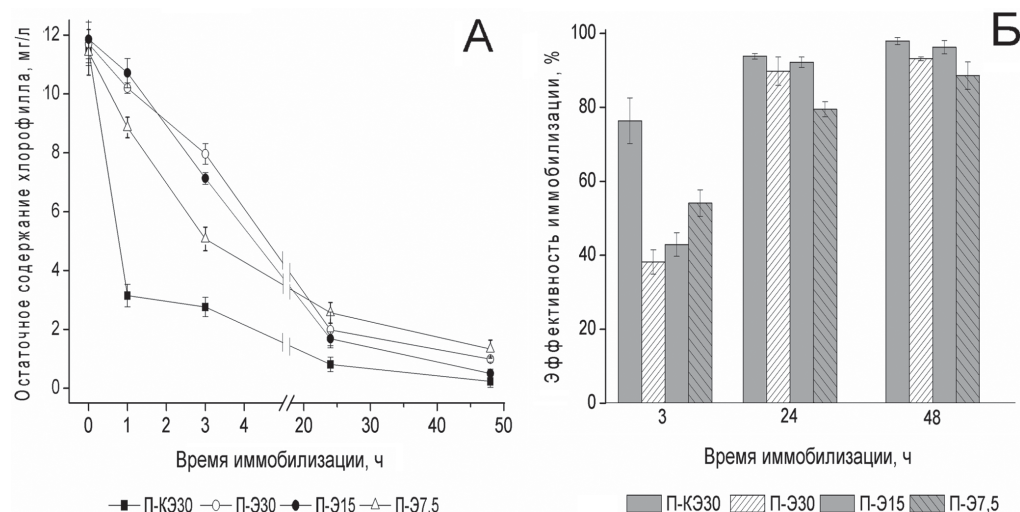


Рис. 2. Оценка кинетики и эффективности иммобилизации клеток *Ch. vulgaris* на сорбентах на основе ПЭИ.

А — кинетика иммобилизации, Б — эффективность иммобилизации

как для квартированного сорбента П-КЭ30 $\Theta_{\text{им}}$ составила около 92,5% (рис. 2, Б).

Следует отметить, что в начальный период иммобилизации (от 1 до 3 ч) отмечалась зависимость $\Theta_{\text{им}}$ сорбентов от соотношения в них основных компонентов “ПЭИ:эпихлоргидрин”. Как видно на рис. 2, снижение количества сшивающего агента в составе сорбента приводило к увеличению количества прикрепленных клеток: через 3 ч инкубации $\Theta_{\text{им}}$ сорбентов с содержанием эпихлоргидрина 30% и 7,5% составляла 39% и 58% соответственно. Указанный эффект может объясняться большим количеством первичных аминогрупп в сорбентах с более низким содержанием сшивающего агента. Именно эти положительно заряженные группы на поверхности сорбентов связываются с отрицательно заряженными карбоксильными и сульфогруппами, входящими в состав компонентов клеточной стенки МВ *Ch. vulgaris*. Через 24 ч инкубации $\Theta_{\text{им}}$ на всех сорбентах составляла от 81 до 94%, а через 48 ч процесс иммобилизации клеток практически завершился (рис. 2).

Таким образом, изучение кинетики иммобилизации клеток МВ на сорбенте П-КЭ30 показало, что использованный прием квартизации сорбента путем присоединения диметилсульфата приводит к существенному увеличению скорости сорбции клеток на поверхности носителя. Чрезвычайно высокая скорость связывания сорбента с клетками МВ в первые часы инкубации, возможно, объясняется наличием в составе сорбента П-КЭ30 четвертичных атомов азота и наибольшей величиной поверхностного заряда, характеризующего этот

сорбент. Сорбенты П-Э30, П-Э15 и П-Э7,5, содержащие только первичные, вторичные и третичные атомы азота, уступали сорбенту П-КЭ30 только на начальном этапе иммобилизации, а через 48 ч $\Theta_{\text{им}}$ всех синтезированных сорбентов на основе сшитого эпихлоргидрином ПЭИ была практически одинаковой (рис. 2, Б).

Для оценки прочности прикрепления клеток *Ch. vulgaris* к поверхности исследуемых поликатионных полимеров изучали процесс их десорбции в растворах NaOH и NaCl. Предполагалось, что электростатические взаимодействия, возникающие между положительно заряженными атомами азота в составе сорбентов и отрицательно заряженными компонентами поверхностных структур клеток *Ch. vulgaris*, должны существенно ослабевать в условиях высоких значений pH и ионной силы раствора. Результаты проведенных экспериментов показали, что значительное увеличение ионной силы среды не приводит к десорбции клеток, а в щелочной среде с поверхности всех изученных сорбентов открепляется не более 12–15% клеток МВ. На основании полученных результатов можно заключить, что клетки *Ch. vulgaris* практически необратимо иммобилизуются на поверхности протестированных полимерных материалов.

Таким образом, можно полагать, что сорбенты на основе сшитых ПЭИ могут быть использованы для эффективной и практически необратимой сорбции клеток фотосинтезирующих микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00112).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rao K.K., Hall D.O. Photosynthetic production of fuels and chemicals in immobilized systems // Trends Biotechnol. 1984. Vol. 2. N 5. P. 124–129.

2. Howard A. Toxic cyanobacterial blooms // Environmental toxicology: current developments / Ed. J. Rose. London: Gordon & Breach Science Publishers, 1998. P. 345–357.

3. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Сна-сов С.Д. Имобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1994. 288 с.

4. Lobakova E.S., Vasilieva S.G., Shibzukhova K.A., Morozov A.S., Solovchenko A.E., Orlova A.A., Bessonov I.V., Lukyanov A.A., Kirpichnikov M.P. Immobilization of cyanobacteria and microalgae on polyethylenimine-based sorbents // Microbiology. 2017. Vol. 86. N 5. P. 629–639.

5. Nuzhdina A.V., Morozov A.C., Kopitsyna M.N., Strukova E.N., Shlykova D.S., Bessonov I.V., Lobakova E.S. Simple and versatile method for creation of non-leaching antimicrobial surfaces based on cross-linked alkylated polyethylenimine derivatives // Mater. Sci. Eng. 2017. Vol. 70. Part 1. P. 788–795.

6. Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Hypercrosslinked polymers: basic principle of preparing the new class of polymeric materials // React. Funct. Polym. 2002. Vol. 53. N 2–3. P. 193–203.

7. Giffin G.A., Castillo F.Y., Frech R., Glatzhofer D.T., Burba C.M. Spectroscopic investigation of proton-conducting, crosslinked linear poly(ethylenimine) hydrochloride membranes // Polymer. 2009. Vol. 50. N 1. P. 171–176.

Поступила в редакцию
31.10.2017

Принята в печать
08.12.2017

MICROBIOLOGY

HARVESTING OF MICROALGAE BIOMASS WITH POLYETHYLENIMINE-BASED SORBENTS

S.G. Vasilieva*, K.A. Shibzukhova, A.S. Morozov, E.S. Lobakova

Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*email: vankat2009@mail.ru

The purpose of this work was to investigate the sorbents on the basis of polyethylenimine (PEI) intended for collecting biomass of microalgae (MA). For this purpose, a series of porous and insoluble polymeric materials were synthesized by cross-linking of PEI with epichlorohydrine. The analysis of kinetics and efficiency of immobilization assessed for the model culture *Chlorella vulgaris*, revealed that already within 3 h of incubation, 39–75% of MA cells attached to the surface of tested sorbents. It was shown that on the initial stage of immobilization the sorption activity of polymeric materials depended on the “PEI:crosslinker” ratio. One of the tested sorbents was additionally quaternized by alkylation with dimethyl sulphate resulting in sharp increase of its sorption activity. The estimation of the MA desorption from polymeric surface showed that most *Ch. vulgaris* cells were practically irreversibly immobilized on all tested sorbents based on the PEI cross-linked with epichlorohydrine.

Keywords: microalgae, immobilization, sorbents, cross-linked polyethylenimines, biomass harvesting, polymeric materials

Сведения об авторах

Васильева Светлана Геннадьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: vankat2009@mail.ru

Шибзухова Карина Ахметовна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: shibzukhova@rambler.ru

Морозов Алексей Сергеевич — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: morozovas84@gmail.com

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф., зам. зав. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru