

УДК 541.64:531.79

## ПОЛИМЕРНЫЕ СИСТЕМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И БИОСЕНСОРЫ НА ИХ ОСНОВЕ (Обзор)

© 1994 г. Н. А. Платэ, В. В. Чупов

Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева Российской академии наук  
117912 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 15.04.94 г.

Рассмотрены особенности синтеза и свойств соиммобилизованных систем синтетические полимеры-клетки микроорганизмов с точки зрения влияния ковалентной иммобилизации клеток на их функциональную активность и способность к репродуцированию, а также влияния клеток на структурные и физико-химические свойства наполненных полимеров, формируемых в присутствии интактных или химически модифицированных фотобактерий при их связывании. Показано, что низкомолекулярные ненасыщенные модификаторы клеток в определенных условиях полностью инактивируют внутриклеточную активность микроорганизмов, в то время как полимерные реакционноспособные носители взаимодействуют с клетками, не затрагивая их внутриклеточных элементов. Предложены способы создания биосенсоров на основе иммобилизованных фотобактерий для качественного и количественного определения микропримесей в водных средах.

При рассмотрении вопросов использования синтетических полимеров для получения иммобилизованных клеток прежде всего следует иметь в виду, что несмотря на многообразие методов иммобилизации клеток и широкий круг используемых полимерных носителей, основные исследования выполнены на клетках микроорганизмов, иммобилизованных химическим включением их в полимерные гели, тогда как для промышленных процессов как правило используют клетки, фиксированные на носителях ионно или сорбционно [1 - 8].

Методы ковалентного связывания клеток с носителями развиты слабее, чем сорбционные. При этом в большинстве опубликованных работ четко прослеживается мысль о необходимости подробного изучения особенностей физиологического и морфологического поведения клеток при иммобилизации [9 - 11].

В этом связи представляет интерес изучение особенностей процессов ковалентной иммобилизации клеток на поверхности синтетических полимеров и в объеме полимерных гидрогелевых матриц, а также исследование структуры и свойств таких систем с точки зрения их функциональной активности. Настоящий обзор посвящен именно этому вопросу и включает результаты, полученные авторами и их сотрудниками в последние 5 - 10 лет.

В качестве модельных клеток с легко отслеживаемой функциональной активностью можно выбрать клетки морских люминесцентных бактерий *Photobacterium Fischeri* (ФБ) и различ-

ные расы дрожжевых клеток *Saccharomyces Cerevisiae* (ДК).

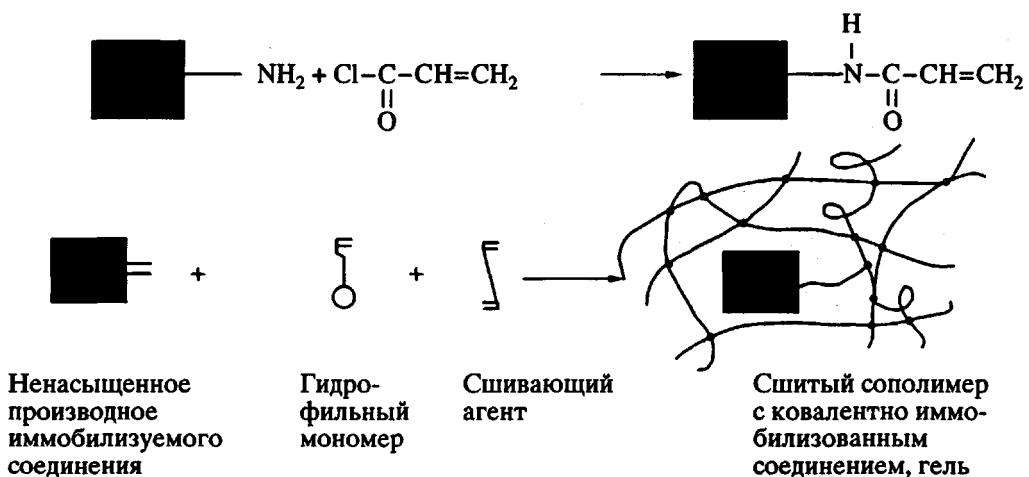
ФБ являются прокариотами (безъядерными клетками) как многие типичные бактерии. Цитоплазма их окружена цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой, основным структурным элементом которой является муреиновый каркас (муреин - сшитый гетерополимер, пептидогликан, сочетающий в себе набор полипептидных и полисахаридных фрагментов неизученного строения), на котором располагаются белки, полисахариды, липиды, белково-липидные комплексы и тейхоевые кислоты [12]. Помимо этого в ФБ функционирует специфический фермент люцифераза - сложная надмолекулярная система, тесно ассоциированная с мембраной, причем местом преимущественной локализации этого фермента является периплазматическое пространство. ФБ обладают высоким уровнем биолюминесценции, легко регистрируемым без вмешательства в жизнедеятельность данного вида клеток. Максимум спектра люминесценции ФБ локализован в области 490 - 500 нм, протяженность спектра составляет 430 - 615 мкм, интенсивность свечения штамма 6 ФБ составляет 1200 - 31000 квант/с на 1 клетку в широком интервале температур.

Среди так называемых темновых и тусклых мутантов ФБ (интенсивность свечения составляет  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$  от интенсивности свечения клеток "дикого" типа) выделены мутанты, свечение которых стимулируется добавлением к их суспензии алифатических альдегидов (альдегид-

зависимые мутанты) *Photobacterium Fischeri*, штамм 148 [13].

Для ковалентной иммобилизации указанных микроорганизмов в матрицах полимерных гидрогелей был выбран разработанный нами

ранее подход [14 - 16], заключающийся во введении реакционноспособных двойных связей C=C в иммобилизованную субстанцию и в последующей сополимеризации полученного ненасыщенного производного с гидрофильным сомономером и сивающим агентом по схеме



Синтез ненасыщенных производных микроорганизмов (НМ) осуществляли реакцией ацилирования ФБ и ДК акрилоил- или метакрилоилхлоридами (АХ или МХ). Поскольку никакой информации о взаимодействии клеток с этими модификаторами в литературе нет, целесообразно рассмотреть особенности реакции взаимодействия ненасыщенных модификаторов с ФБ и ДК.

Наличие молекул белков в клеточных стенках и во внутреклеточном пространстве позволяло надеяться, что взаимодействие указанных модификаторов будет протекать в первую очередь по свободным аминогруппам этих биополимеров, как это имеет место в случае нейтральных белков, ферментов, их ингибиторов и других веществ [14 - 16]. Действительно, массовое соотношение между общим внутреклеточным и мембранным белком в клетках обычно смещено в сторону первого [17]. При взаимодействии АХ или МХ с суспензией клеток в условиях диффузационной прозрачности мембраны в первую очередь ацилированию должны подвергаться внутреклеточные компоненты.

Для оценки механизма взаимодействия микроорганизмов с ненасыщенными модификаторами в качестве модельного соединения можно использовать ацетилхлорид (АЦХ). При этом применение радиоактивных индикаторов делает возможным изучить распределение "активатора" в клетке. С этой целью из  $^{14}\text{C}$ -уксусной кислоты, меченой по концевому атому С, был синтезирован  $^{14}\text{C}$ -ацетилхлорид с удельной активностью 81.4 МБк/мл (2.2 М Кн/мл), с помощью которого

осуществляли модификацию предварительно отмытых от питательной среды ФБ [18].

Для изучения распределения продуктов ацилирования в ФБ суспензию интактных клеток подвергали обработке различными количествами  $^{14}\text{C}$ -меченого АЦХ с последующим разрушением модифицированных клеток осмотическим шоком или ультразвуком и измерением радиоак-

Таблица 1. Результаты радиохимического изучения модификации интактных и предварительно разрушенных ФБ  $^{14}\text{C}$ -меченым ацетилхлоридом

Среднее число меченых групп на 1 клетку	Радиоактивность, % ( $\pm 0.5\%$ )		Отношение радиоактивностей	Способ разрушения клеток*
	в мембранный фракции	в бесклеточном экстракте		
Интактные клетки				
9490	72.7	27.3	2.66 : 1	УЗ
18800	62.8	37.2	1.68 : 1	УЗ
189000	81.8	18.2	4.50 : 1	ОШ
203000	71.4	28.6	2.49 : 1	УЗ
760000	77.9	22.1	3.52 : 1	ОШ
2350000	63.5	36.6	1.74 : 1	УЗ
Разрушенные клетки				
367000	20.3	79.7	1 : 3.92	ОШ
1030000	31.0	69.0	1 : 2.22	УЗ
5110000	30.0	70.0	1 : 2.33	ОШ

\* УЗ – ультразвук, ОШ – осмотический шок.

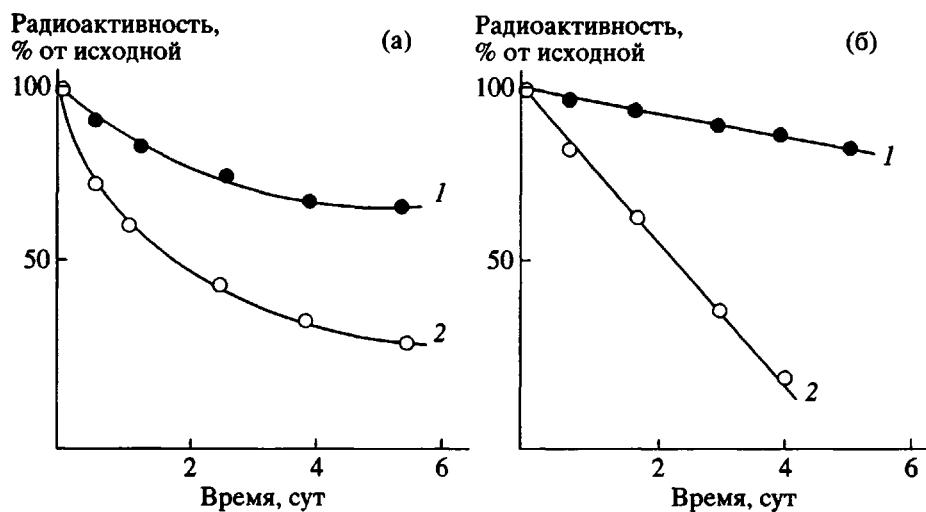


Рис. 1. Зависимость радиоактивности ПААГ от времени его промывания "голодной" (а) и "богатой" (б) питательной средой. Гели получены инкубированием  $8.3 \times 10^8$  меченых  $^{125}\text{I}$  и обработанных АХ (1) или АЦХ (2) ФБ с акриламидом и БИС в присутствии системы ПС/ТМЭДА.

тивности мембранный фракции и внутриклеточного экстракта. Из приведенных в табл. 1 данных видно, что независимо от количества АЦХ и способа разрушения клеток, распределение радиоактивности в мембранный фракции и бесклеточном экстракте практически постоянно и составляет в среднем 2.8 : 1, причем основная доля радиоактивности (63 - 82%) приходится на мембранный фракцию (несмотря на пониженное содержание в ней белкового компонента), а ее меньшая часть (18 - 37%) оказывается во внутриклеточном экстракте. При этом радиоактивность общего белка, выделенного из мембранный фракции, составляет 90 - 95% от общей активности мембранный фракции.

Наблюдаемый эффект распределения радиоактивности обусловлен, по-видимому, двумя обстоятельствами. Первое заключается в том, что мембранны ФБ кроме белков содержат и другие легко ацилируемые по свободным аминогруппам компоненты, например аминосодержащие полисахариды, количество которых в мембранных грамотрицательных бактерий может быть значительным [19]. Вторым обстоятельством являются диффузионные ограничения для проникновения молекул ацилирующих агентов сквозь мембранны клеток. Действительно, при обработке АЦХ предварительно разрушенных ФБ максимум радиоактивности приходится на бесклеточный экстракт, причем соотношение радиоактивности во внутриклеточной и мембранный фракциях (1 : 2.3 - 1 : 3.9) пропорционально соотношению белковых компонентов в тех же фракциях (1 : 5 - 10). Отсюда следует, что при взаимодействии интактных клеток с АЦХ (равно как и с АХ) наиболее эффективно реагируют аминосодержащие компоненты мембранны (и в первую очередь белки по свободным аминогруппам), а сама мембра препятствует

проникновению ацилирующего агента внутрь клетки, хотя и не исключает его целиком. В этом случае локализация модифицирующих групп на поверхности клетки максимальна.

Использованный способ модификации позволяет ввести максимально  $2.35 \times 10^6$  меченых групп на 1 клетку, что составляет 1 - 2% от всего количества АЦХ, взятого в реакцию. При этом в среднем одна ацильная группа приходится на  $185 \text{ \AA}^2$  поверхности клетки, если исходить из того, что площадь всей поверхности ФБ аппроксимируется цилиндром вращения с диаметром 0.5 и высотой 1.5 мкм и равняется  $270 \text{ мкм}^2$ .

Для выяснения возможности модифицированных ФБ участвовать в процессах радикальной copolymerизации, предварительно меченные  $^{125}\text{I}$  клетки обрабатывали АХ из расчета  $10^5 - 10^6$  моль на 1 клетку, отмывали буферным раствором и инкубировали с инициирующей системой персульфат аммония - N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ПС/ТМЭДА). При этом было установлено, что инкубирование обработанных ацетилхлоридом ФБ в течение 2 - 3 ч не приводит к изменению оптической плотности суспензии, т.е. образования укрупненных форм ФБ не наблюдается, а при введении в данную систему бифункционального сшивющего агента, например, N,N'-метилен-бис-акриламида (БИС), образования геля не происходит. В то же время инкубирование  $8.3 \times 10^8$  клеток, обработанных АХ со 100 мг акриламида и 10 мг БИС в 1 мл фосфатного буфера, содержащего 0.3 М NaCl, в присутствии системы ПС/ТМЭДА при 20°C приводит к образованию устойчивого гидрогеля, как и при инкубировании в тех же условиях обработанных АЦХ клеток.

На рис. 1 приведена зависимость радиоактивности гидрогелей, полученных в присутствии модифицированных АХ (кривая 1) и АЦХ (кривая 2)

ФБ, от времени их промывания "голодной" средой (буферным раствором, не содержащим питательных веществ, чтобы исключить размножение клеток) при 4°C. Видно, что ФБ, модифицированные АЦХ, довольно скоро вымываются из геля, в то время как обработанные АХ клетки вымываются медленнее и в меньшем количестве, о чем свидетельствует сохранение высокой радиоактивности гелей при промывании их во времени. При инкубировании этих же образцов гелей в "богатой" питательной среде обнаруживается, что радиоактивность гелей с модифицированными акрилоилхлоридом ФБ снижается незначительно, тогда как радиоактивность гелей с обработанными ацетилхлоридом ФБ падает почти до нуля на четвертые сутки инкубирования (кривая 2). Поскольку накапливающиеся в результате роста бактерии в конце концов разрушают гидрогель на мелкие осколки (что известно как явление "выbuchания" геля [20]), можно полагать, что в первом случае радиоактивно меченные материнские клетки остаются прочно связанными с полимерной матрицей, а некоторое увеличение радиоактивности среды определяется переходом части метки в дочерние клетки при делении. Во втором же случае не существует ограничений для выхода всех клеток в среду при деструкции геля (практически вся радиоактивность оказывается в инкубационной среде).

Факт введения двойных связей на поверхность клеток при их обработке АХ подтверждается и данными по сополимеризации модифицированных клеток с гидрофильным мономером и сшивателем. Это означает, что клетки микроорганизмов могут быть ковалентно иммобилизованы в объеме гидрогеля. Такие продукты должны напоминать сополимеры, получаемые методом полимеризационного наполнения [21], однако в данном случае в качестве винилированного наполнителя выступает сложная биологически активная система – клетка, взаимодействие которой с модификатором может существенно изменить процессы ее жизнедеятельности: функциональную активность и способность к репродуцированию (делению).

На рис. 2 приведена кинетика ингибиования свечения ФБ некоторыми компонентами модифицирующей системы и их аналогами в условиях *in vivo*. Видно, что и БИС, и акриламид, и его насыщенный аналог (ацетамид) ингибируют свечение, причем тем сильнее, чем выше их концентрация в суспензии клеток. После отмычки ФБ от акриламида свежей порцией буферного раствора часть мономера удаляется из клеток и при концентрации акриламида менее 5 мас. % наблюдается восстановление уровня свечения, достигающее 50% от исходного (кривая 4). Аналогичное явление наблюдается и в случае ацетамида и БИС.

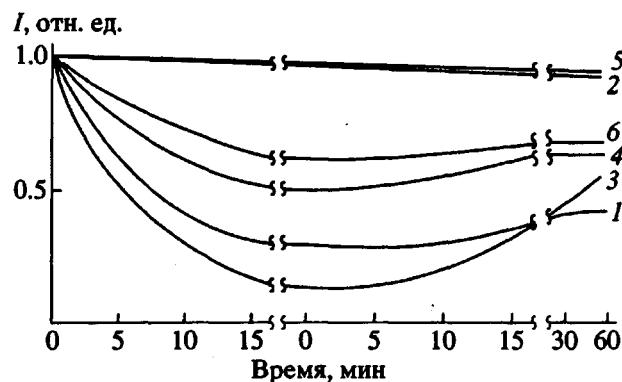


Рис. 2. Кинетика ингибиования свечения ФБ в системе *in vivo*. Концентрация клеток в суспензии  $6.5 \times 10^8$  клеток/мл, объем суспензии 0.5 мл, концентрация акриламида 10.0 (1); 8.2 (3) и 0.1 мас. % (4), ацетамида 10.0 мас. % (2), БИС 0.1 мас. % (6). 5 – интактные ФБ.

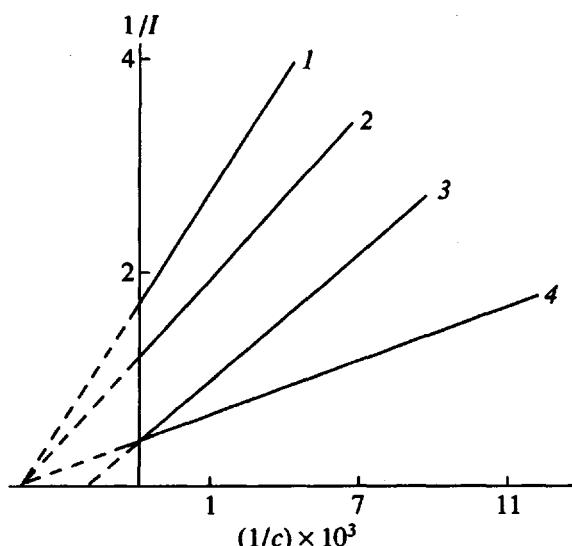


Рис. 3. Влияние акриламида на альдегид зависимую люминесценцию препарата люциферазы из ФБ. Концентрация белка 1.2 мг/мл, концентрация акриламида 0 (1); 2.5 (2); 10.0 (3) и 14.8 мас. % (4).  $T = 25^\circ\text{C}$ .

Полагая, что акриламид может воздействовать непосредственно на внутриклеточную люциферазу, было изучено его влияние на ферментативную реакцию препарата бактериальной люциферазы с ее субстратом (деканалом) *in vitro*. Влияние акриламида на альдегид зависимую люминесценцию препарата люциферазы из ФБ приведено на рис. 3. Как видно, при концентрации акриламида в системе менее 5 мас. % ингибиование носит конкурентный характер по отношению к деканалю. При увеличении содержания акриламида в системе ингибиование становится неконкурентным, а это означает, что тушение билю-

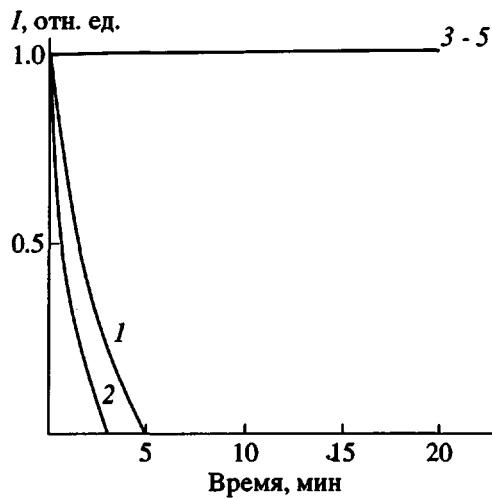


Рис. 4. Зависимость интенсивности свечения ФБ от типа и количества модификатора (мас. %): 1 – 0.2 АЦХ; 2 – 0.2 АХ; 3 – 2.0 ПАА; 4 – 2.0 ПМХ; 5 – интактные ФБ.

минесценции клеток под влиянием акриламида связано с непосредственным влиянием мономера на люциферазную активность, однако такое влияние не является драматическим с точки зрения функциональной активности ФБ при невысоких концентрациях акриламида в системе.

Обработка же ФБ ацилирующими агентами (АХ, АЦХ) приводит к резкому и необратимому тушению люминесценции даже при незначительных концентрациях этих соединений в системе (рис. 4, кривые 1 и 2), причем уровень свечения не восстанавливается после отмыки ФБ от реагентов. Тушение люминесценции в данном случае происходит, очевидно, за счет химического взаимодействия проникающих внутрь клетки молекул галоидангидридов с аминогруппами веществ внутриклеточной ферментной системы. О том,

что это действительно так, свидетельствует отсутствие ингибирующего эффекта при взаимодействии ФБ с полимерными модификаторами – полиакрилоилхлоридом (ПАХ) и полиметакрилиоилхлоридом (ПМХ) (кривые 4 и 5).

Действительно, размеры пор клеточных стенок грамотрицательных бактерий (и ФБ в том числе) таковы, что не позволяют проникать внутрь клетки веществам с ММ выше 600 [22], в силу чего ингибирование люциферазы осуществляется только низкомолекулярными агентами, причем в отсутствие химического взаимодействия ингибирование носит обратимый характер, а при протекании реакций взаимодействия хлорангидридных групп с аминогруппами или другими, способными к взаимодействию, ингибирование становится необратимым.

По-другому ведут себя при ацилировании АХ или МХ дрожжевые клетки. При умеренных концентрациях ацилирующих агентов их активность, определяемая количеством сброшенного в спирт сахара, остается на уровне исходной активности интактных клеток [23]. Это означает, что для ДК используемый модификатор не оказывает ингибирующего действия на их функциональную активность (рис. 6).

Таким образом, модификация клеток микроорганизмов АХ иногда сопровождается потерей ими своей функциональной активности, а иногда нет, и связано это с чрезвычайно высокой чувствительностью внутриклеточных систем к данному модификатору.

Если в процессе иммобилизации нарушаются системы репродукции, то клетка перестает делиться. Как уже отмечалось, иммобилизация ФБ в объеме полиакриламидных гидрогелей (ПААГ) сопровождается исчезновением способности клеток к свечению. Вместе с тем как обработанные ацилирующим агентом, так и иммобилизованные ковалентно, ФБ сохраняют

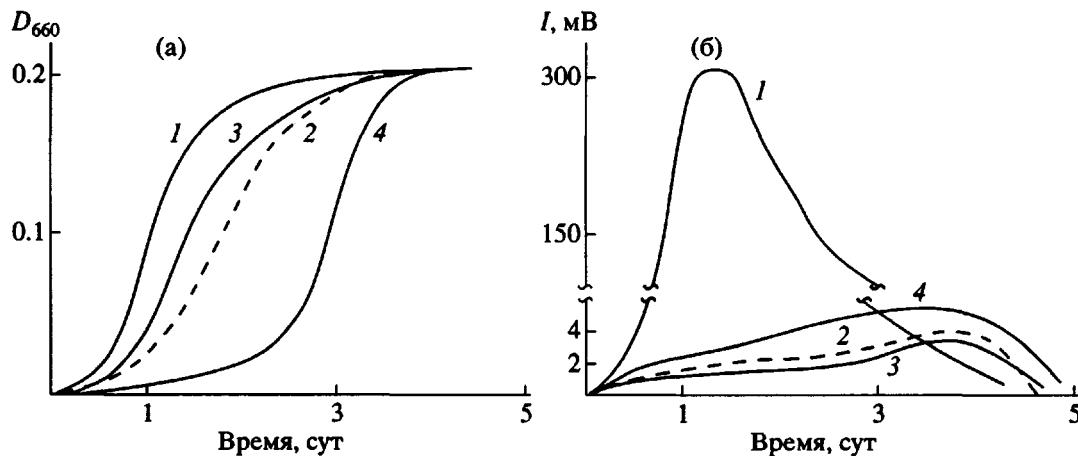


Рис. 5. Кинетика нарастания биомассы (а) и свечения (б) интактных (1), ковалентно иммобилизованных в ПААГ (2) и обработанных 10 мас. % акриламида (3) и 0.2 мас. % АХ (4) ФБ при инкубировании в "богатой" питательной среде.

способность к делению и остаются достаточно жизнеспособными.

На рис. 5 приведена кинетика нарастания биомассы и свечения при ингибиовании в "богатой" питательной среде образцов гидрогелей с иммобилизованными клетками, а также супензии клеток, обработанных компонентами модифицирующей системы. Видно, что объем биомассы модифицированных ФБ возрастает сравнимо с объемом биомассы растущих интактных клеток. Большой лаг-период для ковалентно иммобилизованных ФБ может быть связан с дефицитом кислорода и диффузионными ограничениями для проникновения питательных веществ. У вновь появляющихся клеток наблюдается восстановление люминесценции, хотя при этом свечение супензии ФБ оказывается тусклым: его интенсивность на 2 порядка ниже, чем для интактных клеток. Такое слабое свечение наблюдается и при размножении обработанных акриламидом клеток, что может быть связано с образованием "темнового" варианта ФБ, известного для них как мутантный штамм 148. К сожалению, имеющиеся к настоящему времени сведения о репродуцировании иммобилизованных клеток микроорганизмов крайне ограничены, противоречивы, а работ, посвященных изучению морфологии иммобилизованных клеток, практически нет.

Ковалентная иммобилизация ДК в матрицы полимерных гидрогелей не сопровождается потерей их бродильной активности. Ковалентно иммобилизованные, физические включенные и интактные клетки имеют практически одинаковую абсолютную бродильную активность (количество сброшенного в спирт сахара постоянно для всех трех систем), но скорости процесса изменяются: в первом случае скорость ферментации максимальна, что может быть связано с влиянием гидрогелевой матрицы, способствующей повышению локальной концентрации сахара вблизи активных центров ферментных систем иммобилизованных клеток за счет дополнительной сорбции [23].

Таким образом, путем "активирования" микробиальных клеток АХ и последующей сополимеризации их с мономерами и сивающими агентами удается получать препараты иммобилизованных клеток с сохраняющейся жизнеспособностью и (в некоторых случаях) с высокой функциональной активностью. Угнетение же функциональной активности клеток при их взаимодействии с ненасыщенными модификаторами может иметь самостоятельное значение в плане регулирования их метabolизма.

Такое поведение иммобилизованных клеток определяется структурой полимерных гидрогелей, формируемых в присутствии НМ. Действительно, при анализе особенностей структурообразования в трех системах, таких как ПААГ, полученные радикальной сополимеризацией вод-

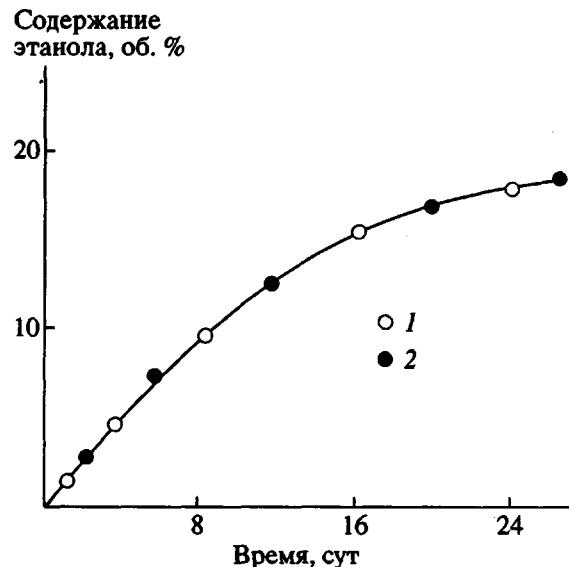


Рис. 6. Изменение содержания спирта в супензии, сбраживаемом интактными (1) ДК, и обработанными 2 мас. % АХ при 4°C (2). Использовано 50 мл супензии ДК, содержащей 30 млн. клеток/мл, на 1 мл виноградного сусла.

ного раствора, содержащего 10 мас. % акриламида и 0.5 мас. % БИС (содержание сивающего агента от мономера составляет 5%) (гель I); ПААГ, полученные сополимеризацией такого же раствора, но в присутствии различного количества интактных ФБ (гель II); ПААГ, полученные сополимеризацией первой системы в присутствии разного количества модифицированных ФБ со средним содержанием связей C=C на 1 клетку, равным  $10^4$  -  $10^6$  (гель III), был установлен ряд интересных закономерностей.

На рис. 7а приведены кинетические кривые набухания гелей в искусственной морской воде. Как видно, степени набухания гелей I - III и скорости их набухания различны. Наибольшей набухаемостью обладает гель II, меньшая набухаемость наблюдается у геля I, а хуже всего набухает гель III. Если равновесно набухшие гели подвергнуть действию ДМСО, разрушающего клетки [24], вымыть разрушенные клетки и провести повторное набухание после высушивания образцов, то характер и тип кривых набухания сохранится (рис. 7б), хотя абсолютные значения величины  $S_r$  несколько возрастут. Это означает, что ФБ оказывают влияние на характер закладывающихся при полимеризации структур. Такое влияние должно быть тем большим, чем большее количество клеток присутствует в полимеризующейся системе. На рис. 8а представлена зависимость  $S_r$  от количества вводимых в полимеризующуюся смесь активированных акрилоилхлоридом ФБ. По сравнению с гелем I (начиная с некоторого значения концентрации ФБ) наблюдается снижение величины  $S_r$ . При дальнейшем увеличении

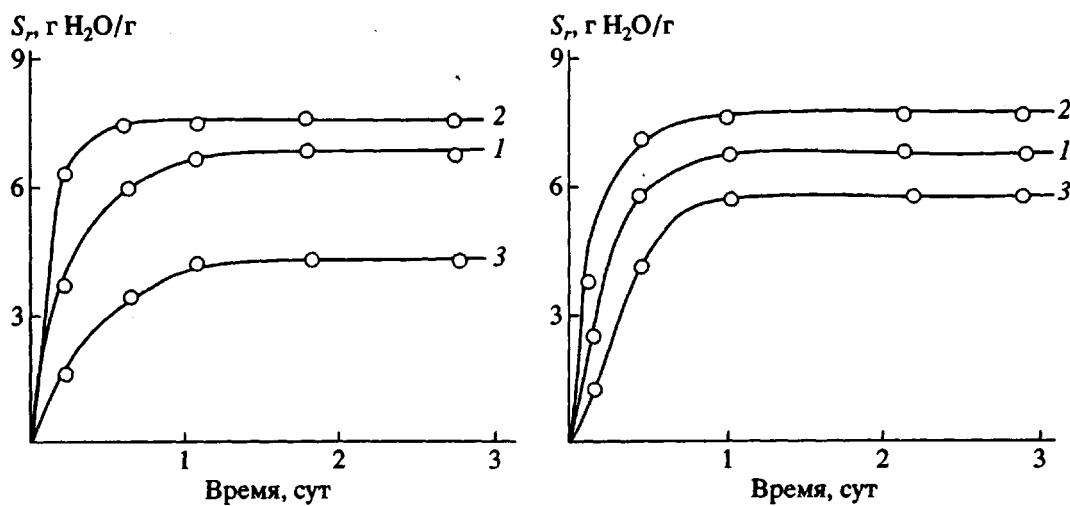


Рис. 7. Кинетические кривые набухания гелей I (1), II (2) и III (3) в искусственной морской воде при 20°C до (а) и после (б) удаления ФБ.

количества клеток в исходной смеси на 2 порядка емкости гелей по растворителю изменяются незначительно. В случае сополимеризации акриламида с БИС в присутствии интактных клеток повышение их концентрации приводит к заметному падению величины  $S_r$  (рис. 8б, кривая 1). Можно полагать, что увеличение концентрации гидрофобных ненабухающих частиц, которыми являются ФБ, равносильно повышению степени сшивки ПААГ. Характерно, что и в этом случае разрушение клеток и их удаление из геля также сопровождается некоторым ростом величины  $S_r$ , причем в случае активированных клеток набухаемость изменяется незначительно, тогда как для геля II она оказывается пропорциональной количеству вводимых в исходную смесь интактных клеток (рис. 8а, 8б, кривые 2).

Следовательно, в первом случае образуется гель с меньшими размерами пор, чем гель II. Иными словами, присутствие интактных клеток в системе приводит к образованию гидрогелей с большими размерами пор. По-видимому, ФБ выступают в этом случае в качестве твердого нерастворимого структурного модификатора, причем размеры макропор геля при этом должны быть соизмеримы с размерами клеточных агломератов, образующихся в зависимости от концентрации суспензии клеток. Следовательно, размеры макропор гидрогелей, формируемых в присутствии ФБ, определяются как качеством клеток (интактные или модифицированные), так и их количеством.

Одним из условий жизнедеятельности иммобилизованных клеток является высокая проница-

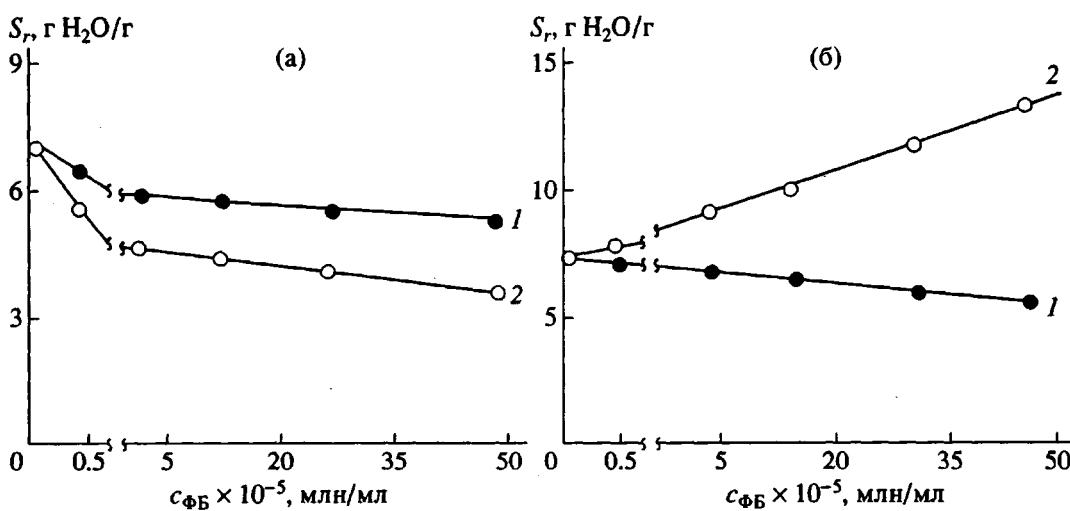


Рис. 8. Зависимость степеней набухания гелей II (а) и III (б) до (1) и после (2) удаления клеток от концентрации ФБ в исходной мономерной смеси.

емость матрицы, в которой они иммобилизованы, для питательных веществ и продуктов метаболизма. Проницаемость гелей I - III можно оценить по значениям коэффициентов диффузии для различных веществ.

Рассчитанные из экспериментальных данных значения коэффициентов диффузии приведены в табл. 2. Как следует из таблицы, величина  $D$  для гелей III оказывается ниже, чем для гелей I и II. Для образцов гелей I заметное снижение скорости проникновения вещества в гель наблюдается начиная с декстрана с  $M = 20000$ , декстран с  $M = 500000$  не проникает сквозь поры геля, тогда как для образцов геля III заметное снижение скорости диффузии наблюдается уже для полиэтиленгликоля с  $M = 1000$ , а декстран с  $M = 70000$  вообще не диффундирует в гель. Эти данные свидетельствуют о том, что, действительно, количество и качество ФБ определяют тип макроструктуры гелей.

Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод о том, что при сополимеризации акриламида с БИС в присутствии ФБ последние выступают в роли активного структурного модификатора. Если введение интактных клеток, для которых характерно образование колоний (ассоциатов) в исходной суспензии, приводит к существенному возрастанию размеров макропор геля, то клетки, несущие на своей поверхности связи  $C=C$  (напомним, что на поверхность клетки удастся ввести не более  $2 \times 10^6$  ацильных групп), способны вступать в реакции сополимеризации с акриламидом и БИС. В этом случае, с одной стороны, они являются дополнительным сивающим агентом, уменьшающим размеры пор геля (а, следовательно, его набухаемость и проницаемость), а с другой - могут выступать в качестве гидрофобных включений, придавая всей системе в целом характер наполненного материала [25].

Для выяснения механизма структурообразования в таких системах необходимо знание молекулярно-массовых характеристик и строения

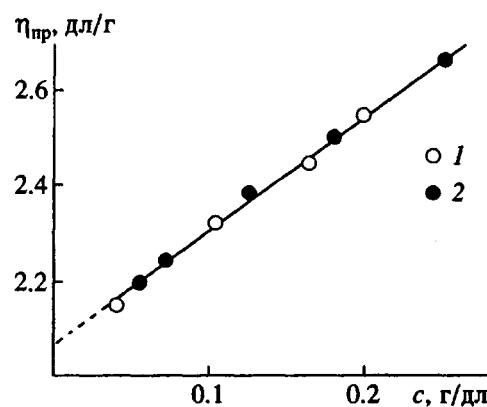


Рис. 9. Зависимость приведенной вязкости растворов ПАА в воде (1) и в 30%-ной  $H_2O_2$  (2).

ПАА-цепей, образующих собственно матрицу геля. Как известно [26], ПААГ чувствительны к действию пероксида водорода, причем количество образующихся при расщеплении гелей метилолакриламидных групп составляет ровно половину от количества звеньев сшивателя в сополимере, а образующийся продукт хорошо растворим в воде. Использование пероксидного расщепления ПААГ возможно только в том случае, если при этом не происходит деструкции основной полимерной цепи. На рис. 9 представлена зависимость приведенной вязкости раствора линейного ПАА от его концентрации в воде и в 30%-ном растворе  $H_2O_2$ . Как видно, величина  $\eta$  в обоих случаях практически одинакова, а значения рассчитанных по формуле

$$[\eta] = 6.8 \times 10^{-2} M^{0.66} \quad [27]$$

величин  $M_\eta$  составляют  $1.98 \times 10^5$  и  $1.96 \times 10^5$  соответственно и совпадают в пределах точности измерений, что делает правомерным использование указанной методики для оценки длины цепей ПАА.

Таблица 2. Значения коэффициентов диффузии некоторых полимеров в гелях I - III

Соединение	$M$	Коэффициент диффузии $D$ , $m^2/c (\pm 5\%)$		
		гель I	гель II	гель III
Полиэтиленгликоль	600	-*	-*	-*
	1000	-*	-*	$5.07 \times 10^{-10}$
Декстран	20000	$7.93 \times 10^{-10}$	-*	$2.62 \times 10^{-10}$
	40000	$1.79 \times 10^{-10}$	-*	$5.33 \times 10^{-10}$
	70000	$7.11 \times 10^{-11}$	-*	Не диффундирует
	500000	Не диффундирует	-*	То же
Голубой декстран	2000000	То же	$5.05 \times 10^{-11}$	То же

\* Измерение коэффициентов диффузии невозможно из-за чрезвычайно высокой скорости проникновения вещества в гель.

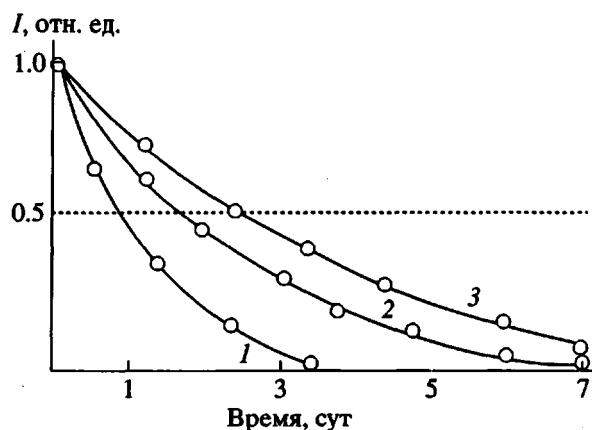


Рис. 10. Стабильность свечения интактных (1) и модифицированных ПМХ (2) и ВП-МХ (3) клеток при их исходной концентрации  $6.7 \times 10^8$  клеток/мл.

Рассчитанные значения  $\bar{M}_n$  для гелей I, II и III равны 47900, 7600 и 28300 соответственно. Это различие можно объяснить исходя из предположения о том, что при одинаковых условиях инициирования ФБ, содержащие связи C=C, более активно участвуют в процессах обрыва цепей [28].

Таким образом, присутствие ФБ в полимеризующейся системе акриламид-БИС оказывает влияние как на ранние стадии структурообразования в гидрогелевой системе, так и на макро-свойства гелей в целом, а образующиеся продукты можно рассматривать как привитые на клетки макромолекулы синтетических полимеров.

В табл. 3 приведены результаты механических испытаний образцов гелей I - III, из которой видно, что наибольшие значения  $\bar{M}_c$  имеют гели с включенными клетками (гели II), а минимальные расстояния между узлами сетки — гели III, что полностью согласуется с приведенными выше данными по набухаемости и проницаемости этих гидрогелевых систем.

Приведенные результаты позволяют заключить, что присутствие клеток микроорганизмов в полимеризующейся системе акриламид-БИС изменяет характер ее гелеобразования. Введение

способных к агломерации интактных клеток эквивалентно введению в систему "неактивного" наполнителя и приводит к увеличению средних размеров пор геля, его набухаемости и проницаемости. Клетки, несущие на своей поверхности двойные связи, способны выступать в роли "активного" наполнителя. При этом образующийся сополимер имеет блочный характер и большую частоту сшивки, что в совокупности с его дифильным строением (участок гидрофильного ПАА — участок гидрофобной клетки) определяют комплекс его физико-химических свойств, отвечающих за процессы метаболизма клеток и их деления.

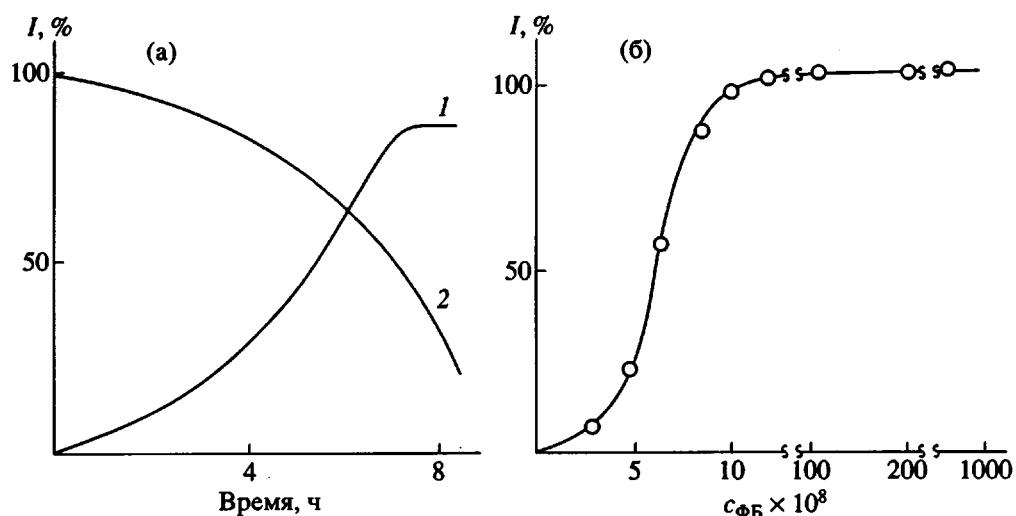
Выше было показано, что ингибиование функции свечения ФБ низкомолекулярными модификаторами является результатом проникновения последних внутрь клетки и непосредственного их взаимодействия с внутриклеточной люциферазной системой. Поскольку размеры пор внешней мембранны клеточной оболочки грам-отрицательных бактерий позволяют проникать в клетку веществам с ММ не более 600 - 700, можно ожидать, что модификация клеток реакционно-способными полимерными веществами позволит и осуществить связывание ФБ с полимером, и сохранить активность люциферазы.

Для проверки этого предположения в соответствии с работой [29] были синтезированы линейные полимерные модификаторы: гомополимеры МХ с  $M = 7000$  и  $20000$  (ПМХ 7000 и ПМХ 20000 соответственно) и сополимер ВП-МХ, содержащий 7 мол. % МХ с  $M = 30000$  (ВП-МХ 30000).

Обработку клеток полимерами проводили следующим образом. Навеску полимера помещали в суспензию ФБ, тщательно отмытых от компонентов питательной среды, и инкубировали при перемешивании до полного растворения полимеров (30 - 60 мин). Взаимодействие клеток с ПМХ оценивали вискозиметрическим методом, измеряя удельную вязкость раствора полимера до и после контакта с клетками (клетки отделяли центрифугированием при 7000 об/мин). Контролем служила суспензия клеток, обработанная растворами неионогенных и нереакционноспособных полимеров: ПЭГ, ПВП, ПАА с  $M = 20000$  различной концентрации. Результаты, представ-

Таблица 3. Модули упругости, средние значения  $[\eta]$ ,  $M_n$ ,  $\bar{M}_c$  и средняя длина цепей ПАА между сшивками для образцов гелей I - III

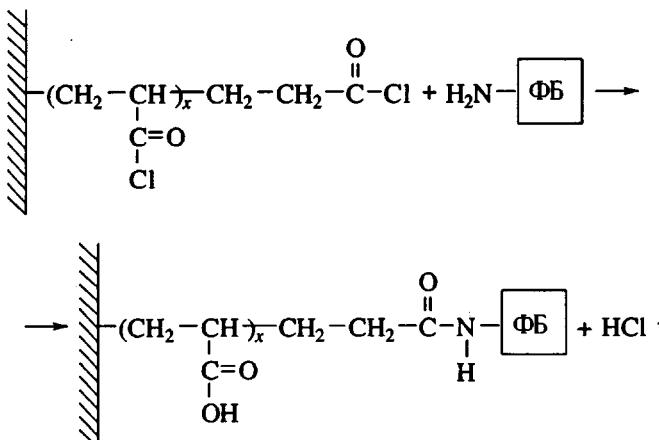
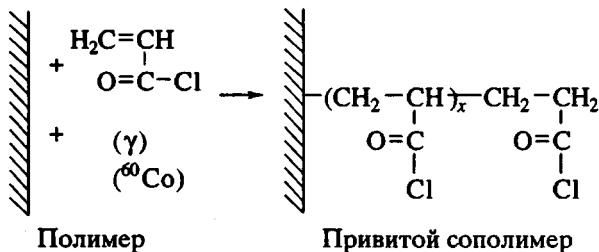
Образец геля	$[\eta]$	$M_n \times 10^{-3}$	$G, \text{Н/м}^2 (\pm 5\%)$	$\bar{M}_c$	Среднее число звеньев акриламида между сшивками $n$
Гель I	0.23	28.3	$1.267 \times 10^4$	$18300 \pm 900$	$260 \pm 10$
Гель II	0.35	47.9	$1.578 \times 10^4$	$16300 \pm 1300$	$370 \pm 20$
Гель III	0.08	7.6	$0.856 \times 10^4$	$15200 \pm 700$	$210 \pm 10$



**Рис. 11.** Зависимость уровня свечения клеток на пленке от времени ее инкубирования с суспензией клеток, содержащих  $5.6 \times 10^8$  клеток/мл (1) и самой суспензии (2) (а) и от концентрации суспензии клеток (б). Время инкубирования 8 ч.

ленные в табл. 4 показывают, что ПМХ 20000 значительно хуже взаимодействует с ФБ, нежели ПМХ 7000. Обработка супензии ФБ сополимером ВП-МХ также сопровождается связыванием его с клетками, однако количество присоединенного модификатора меньше, чем ПМХ. Следует отметить, что ПЭГ, ПАА и ПВП вообще не связываются с ФБ и практически никак не влияют на их свечение, что видно из рис. 4 и 10, на котором приведена зависимость свечения ФБ от времени при обработке указанными полимерами. Следовательно, взаимодействие ПМХ с ФБ не приводит к угнетению функциональной активности клеток и позволяет получать соиммобилизованные системы "прививочного" типа.

Такие соиммобилизованные системы полимер-клетка могут быть получены не только сополимеризационным путем, но и взаимодействием интактных клеток с реакционноспособными полимерными носителями. Используя привитые на поверхность "обычных" биоинертных полимеров (ПЭ, ПЭТФ) АХ или МХ [30], удается получить соиммобилизованные системы полимер-микроорганизм без потери функциональной активности (биолюминесценции) клеток. Схематически этот процесс может быть представлен следующим образом:



Иммобилизацию ФБ осуществляли инкубированием их суспензии с привитым сополимером

**Таблица 4.** Взаимодействие фотобактерий с полимерными модификаторами

Полимерный модификатор	Концентрация раствора, г/мл		Число молей полимера, связанного с 1 клеткой*
	до контакта с ФБ	после контакта с ФБ	
ПМХ 7000	0.0100	0.0078	$(3.03 \pm 0.05) \times 10^7$
	0.0050	0.0026	$(1.20 \pm 0.03) \times 10^7$
ПМХ 20000	0.0100	0.0097	$(1.29 \pm 0.03) \times 10^6$
	0.0050	0.050	—
ВП-МХ 30000	0.0010	0.0010	—
	0.0050	0.0043	$(2.21 \pm 0.06) \times 10^4$

\* Концентрация суспензии клеток составляет  $7.2 \times 10^9$  клеток/мл.

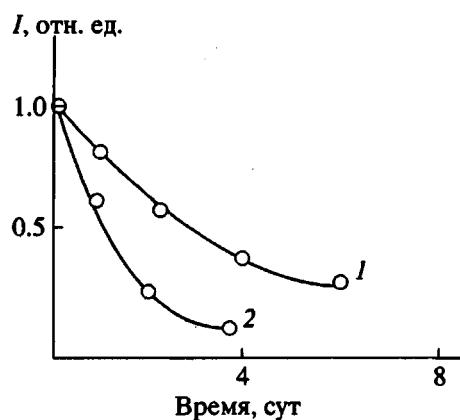


Рис. 12. Стабильность свечения пленки, содержащей  $3.8 \times 10^7$  клеток/см<sup>2</sup> (1) и супензии ФБ, содержащих  $3.1 \times 10^7$  клеток/мл (2) при 20°C.

при 0 - 4°C из расчета 1 мл супензии на 1 - 2 см<sup>2</sup> поверхности пленки. Эффективность иммобилизации определяли двумя способами: с помощью метода радиоактивных индикаторов, используя меченные изотопом  $^{125}\text{I}$  фотобактерии, и по количеству высвобождающегося аденоциантифосфата.

На рис. 11а приведена кинетика изменения интенсивности свечения супензии клеток, контактирующих с пленкой, и самой пленки. Видно, что интенсивность свечения пленки возрастает, но после 7 - 8 ч инкубирования свечение пленки перестает возрастать. В то же время уровень свечения клеток, иммобилизованных на пленке, определяется и временем контакта, и концентрацией ФБ в исходной супензии: возрастание свечения

Таблица 5. Зависимость эффективности иммобилизации фотобактерий на пленке ПЭ-МХ от условий инкубирования пленки с супензией клеток

Степень прививки МХ $n \times 10^8$ , моль/см <sup>2</sup>	Концентрация исходной супензии ФБ, клеток/мл	Объем супензии, мл/см <sup>2</sup> поверхности пленки	Количество иммобилизованных на 1 см <sup>2</sup> пленки клеток ( $\pm 10\%$ ), определенное по	
			АТФ-анализу	по $^{125}\text{I}$
3.2	$2.8 \times 10^8$	2.0	$0.81 \times 10^7$	$3.85 \times 10^7$
4.7	$5.6 \times 10^8$	1.0	$1.48 \times 10^7$	$9.21 \times 10^7$
5.4	$5.6 \times 10^8$	1.0	$1.37 \times 10^7$	$9.60 \times 10^7$
6.5	$3.3 \times 10^9$	1.0	$2.92 \times 10^7$	$7.33 \times 10^7$
4.7*	$5.6 \times 10^7$	1.0	-	$0.07 \times 10^7$
6.5*	$3.3 \times 10^9$	1.0	-	$0.28 \times 10^7$

\* Привитые пленки предварительно прогидролизованы водой.

пленок происходит вплоть до  $8 \times 10^8$  клеток/мл, после чего увеличение концентрации клеток даже на порядок не вызывает увеличения свечения пленки (рис. 11б).

Данные по иммобилизации клеток в зависимости от условий ее проведения приведены в табл. 5. Как видно, значения величины эффективности иммобилизации, определенные биохимически (по количеству высвобождающегося АТФ) и радиохимически, совпадают по порядку величин, причем этот порядок ( $10^7$  клеток/см<sup>2</sup>) один и тот же для всех использованных образцов с различными степенями прививки.

Иммобилизованные на нерастворимой пленке ФБ не только не теряют абсолютный уровень биолюминесценции, но и повышают стабильность свечения во времени, что проявляется в увеличении времени полуэтатухания люминесценции у этих образцов в 4 - 5 раз по сравнению с интактными клетками (рис. 12).

Химически связанные с полимерной подложкой клетки сохраняют и способность к делению. Так, после инкубирования в богатой питательными веществами среде в течение 1 сут пленки с иммобилизованными меченными  $^{125}\text{I}$  ФБ сохраняют около 60% радиоактивности, в то время как радиоактивность среды возрастает на 40% и одновременно наблюдается прирост биомассы: оптическая плотность среды при  $\lambda = 660$  нм возрастает за 1 сут с 0.006 до 0.18.

Итак, иммобилизация микроорганизмов на твердой нерастворимой полимерной подложке приводит к получению полимерных материалов с ковалентно иммобилизованными клетками, обладающими жизнеспособностью, высокой функциональной активностью и повышенной стабильностью ее проявления, что может быть использовано для практического применения.

Перспективность применения биолюминесценции для анализа веществ определяют три основных обстоятельства. Во-первых, современные методы детектирования излучения в оптическом диапазоне достигли чувствительности, позволяющей считать отдельные кванты. Второе - это высокая специфичность, определяющаяся ферментативной реакцией, лежащей в основе метода. Третье обстоятельство заключается в том, что энергетическое обеспечение биолюминесценции осуществляется через общие метаболические пути, а это позволяет использовать цепи сопряжения ферментов с люциферазой таким образом, что большинство ключевых метаболитов и антиметаболитов может быть измерено посредством люминесценции. Кроме того, стоимость биолюминесцентных измерений (которые являются экспресс-методами) мала благодаря относительной дешевизне используемых реагентов, а источники бактериальной люциферазы практически неиссякаемы.

При высокой чувствительности и воспроизведимости метод бактериальной биолюминесценции применяется для анализа субстратов бактериальной люминесцентной системы: флавинов, пиридин-нуклеотидов, липидов, кислорода; NAD/P/H-зависимых ферментов и их субстратов; различных гидрофобных соединений, наркотиков, канцерогенов, инсектицидов: АТФ и АДФ-зависимых ферментов (посредством сопряженных ферментных систем) и т.д. [31 - 35]. Иными словами, фотобактерии сами по себе являются сенсорными системами.

Препараты ковалентно иммобилизованных ФБ можно рассматривать в качестве биосенсоров для проведения анализа в потоке. Модифицированную клетками полимерную подложку из ПЭ площадью  $1 \text{ см}^2$  помещают в специальный проточный реактор из стекла объемом  $1 \text{ см}^3$  (рис. 13). Этот реактор заключают в светонепроницаемую камеру перед фотоэлектронным умножителем люминометра. Реактор соединяют с проточной системой (подающей инкубационную среду и раствор анализируемого соединения), скорость потока в которой ( $4 - 20 \text{ мл/мин}$ ) задается блоком управления по заданной программе (рис. 14). После введения раствора анализируемого соединения и регистрации сигнала реактор промывают свежей порцией среды (фосфатный буферный раствор, содержащий  $\text{NaCl}$ ) до восстановления уровня биолюминесценции к исходному (автоматическом режиме), после чего система готова для проведения нового анализа.

При введении ингибитора в проточный реактор с иммобилизованными ФБ наблюдается тушение биолюминесценции, которое выходит на стационарный уровень через 1 мин (рис. 15). Для отмычки ингибитора и восстановления уровня свечения на  $95 - 98\%$  от исходного требуется  $8 - 9$  мин при скорости потока  $15 \text{ мл/мин}$ , после чего возможно введение в поток новой порции раствора, содержащего *m*-хлоркарбонилфенилгидразон. При этом уменьшение интенсивности свечения коррелирует с моментом появления ингибитора в анализируемой пробе, что позволяет считать пленку с иммобилизованными ФБ датчиком для определения органических веществ [36].

При анализе альдегидов в реактор помещают  $1 \text{ см}^2$  пленки с иммобилизованными клетками альдегидзависимого мутанта ФБ, штамм 148. Введение в поток тетрадеканаля в концентрации  $10^{-5}\%$  вызывает быстрое нарастание интенсивности свечения. После достижения максимальной интенсивности реактор промывают средой в течение 1.5 мин до восстановления работоспособности сенсора (рис. 16). В данном случае наблюдается линейная зависимость интенсивности свечения от концентрации альдегида в интервале концентраций  $10^{-3} - 10^{-6} \text{ моль/л}$  (рис. 17), что позволяет проводить количественное тестирование альдегидов на одном и том же образце. Такой

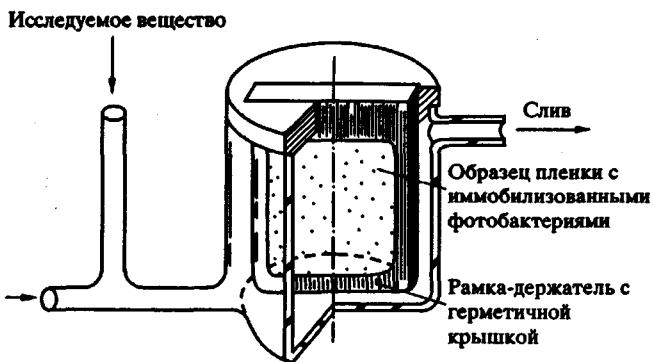


Рис. 13. Схематическое изображение проточного реагтора.



Рис. 14. Блок-схема установки для анализа растворов иммобилизованными ФБ.

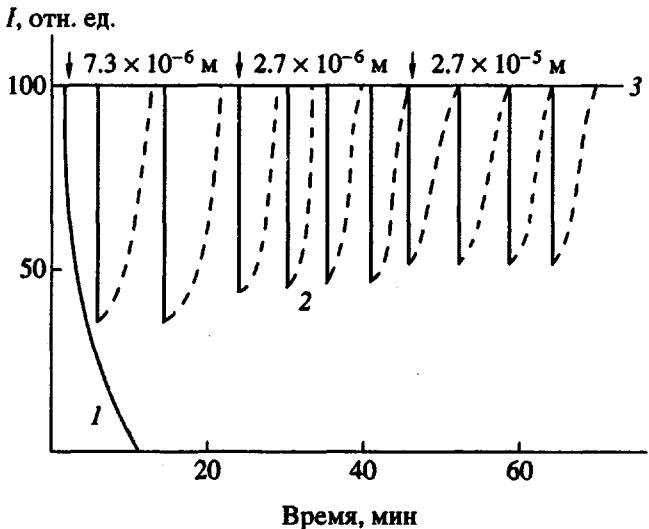


Рис. 15. Ингибирование свечения интактных (1) и ковалентно иммобилизованных на ПЭ-пленке (2) ФБ *m*-хлоркарбонилфенилгидразоном в потоке и временная зависимость интенсивности люминесценции супензии интактных клеток (3).

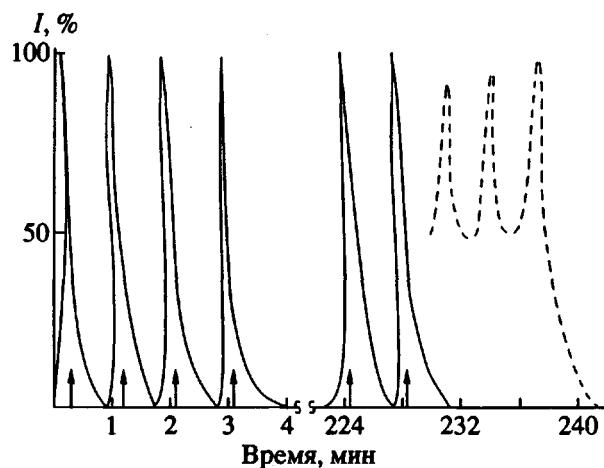


Рис. 16. Зависимость интенсивности свечения ПЭ-пленки с иммобилизованными ФБ от времени при введении  $3.5 \times 10^{-7}$  моль/л тетрадеканаля в проточный реактор. Момент появления альдегида отмечен стрелкой.

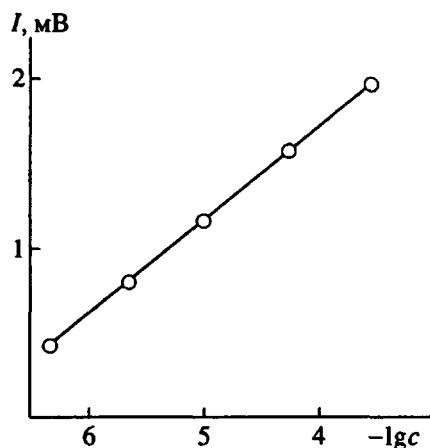


Рис. 17. Зависимость интенсивности свечения ПЭ-пленки с иммобилизованными ФБ от концентрации тетрадеканаля в потоке.

подход дает возможность многократного использования (более 60 опытов на одном образце пленки в день) иммобилизованных ФБ в анализе альдегидов в автоматическом режиме, что в сочетании с высокой стабильностью препаратов дает основания для использования их в аналитических определениях [37].

Таким образом, существует реальная возможность ковалентной иммобилизации модифицированных ненасыщенными соединениями клеток микроорганизмов в объеме полимерных гидрогелей. Иммобилизация клеток по-разному влияет на параметры сеток сшитых сополимеров, микро- и макроструктуру которых удается регулировать варьированием качества и количества иммобилизуемых ФБ или ДК. При этом оказывается возможным регулировать функциональную ак-

тивность клеток и их способность к репродуцированию. При невозможности использования сополимеризационного метода оказывается полезным способ получения гидрогелевых сорбентов реакциями полимераналогичных превращений предварительно синтезированных реакционноспособных сополимеров. Взаимодействием таких реакционноспособных носителей с микроорганизмами удается получить высокоактивные сорбенты иммобилизованные системы, проявляющие свойства биосенсоров, подходящих для аналитических целей.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chibata I. // Immobilized Microbial Cells. SFM. 1979.
- Зуева Н.Н., Яковлева В.И., Веревкин А.Н., Аксюк И.В., Арен А.К., Березин И.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1985. Т. 21. № 3. С. 334.
- Чеховская Т.П. // Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Пущино, 1978. С. 62.
- Гвоздяк П.И. // Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Пущино, 1978. С. 80.
- Campagne C.P., Girard F., Morin N. // Biotechnol. Lett. 1988. V. 10. P. 463.
- Belfort J. // Biotechnol Bioengin. 1989. V. 33. P. 1674.
- Cottenceau G., Dherbomez M., Lubochinsky B., Letellier F. // Enzyme Microb. Tehnol. 1990. V. 12. P. 355.
- Carenza M., Yoshida M., Kumakura M., Fujimura T. // Eur. Polym. J. 1993. V. 29. № 7. P. 1013.
- Введение в прикладную энзимологию / Под ред. Березина И.В., Мартинека К. М.: МГУ, 1982.
- Kinoshita S., Muranata M., Okada H. // J. Ferment. Technol. 1975. V. 53. № 4. P. 223.
- Chen T.S. // J. Chem. Technol. and Biotechnol. 1982. V. 32. № 7. P. 669.
- Баранова Н.А., Александрушкина Н.А., Егоров Н.С. // Биологические науки. 1980. Т. 12. С. 77.
- Шумихин В.Н., Данилов В.С., Егоров Н.С. // Биофизика. 1981. Т. 26. № 1. С. 130.
- Platé N.A., Valuev L.I., Chuprov V.V. // Pure Appl. Chem. 1984. V. 56. № 10. P. 1351.
- Платэ Н.А., Валуев Л.И., Синани В.А., Чупов В.В. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 2. С. 174.
- Синани В.А., Валуев Л.И., Чупов В.В., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 10. С. 2088.
- Иост Х. Физиология клетки. М.: Мир, 1975.
- Усова А.В., Чупов В.В., Валуев Л.И., Лыс Я.И., Федосеев В.М., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. Б. 1988. Т. 30. № 4. С. 304.
- Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1972.
- Гулевская С.А., Суходольская Г.В. // Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Пущино, 1978. С. 149.
- Иванчев С.С. Радикальная полимеризация. Л.: Химия, 1985.
- Тысячная И.В., Фечина В.Я., Яковлева В.И., Березин И.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1984. Т. 20. № 4. С. 433.

23. Чупов В.В., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // Тез. докл. В Всесоюз. симп. "Инженерная энзимология". Кобулети, 1985. Ч. 1. С. 35.
24. Rodionov Yu.V., Lebedeva N.V., Kondratieva E.N. // Arch. Microbiol. 1986. V. 143. № 3. P. 345.
25. Чупов В.В., Усова А.В., Землянская В.А., Платэ Н.А. // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1991. Т. 32. № 3. С. 75.
26. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981.
27. Brandrup J., Immergut E.H. // Polymer Handbook. New York; London; Sidney; Toronto: Wiley, 1975.
28. Imoto M., Ouchi T., Nakamura Y., Morita E., Tokujama Y., Obata H., Iwamoto S. // J. Polym. Sci., Polym. Lett. 1979. V. 17. № 6. P. 347.
29. Халиков Т., Наджимутдинов Ш., Усманов Х.У. // Азерб. хим. журн. 1972. № 1. С. 90.
30. Бурдыгина И.Ф., Чупов В.В., Валуев Л.И., Александрова Л.В., Голубев В.Б., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1982. Т. 24. № 2. С. 372.
31. Chang-Kee H., Tamiya E., Takeushi T., Karube I. // Biotechnol. Bioengin. 1993. V. 4. P. 1107.
32. Lloyd D., James K., Williams J., Williams N.A. // Analyt. Biochem. 1981. V. 116. P. 17.
33. Quistorff B., Chance B., Hundling A. // 3rd Symp. Int. Soc. Oxygen Tr. New York: Acad. Press, 1977. P. 126.
34. Imaeda K., Ohisawa K., Uchijama K. // Bunseku Kagaku. 1983. V. 32. № 2. P. 159.
35. Makigushi N., Arita M., Asai J. // Ferment. Technol. 1980. V. 58. № 1. P. 17.
36. Чупов В.В., Усова А.В., Платэ Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. № 2. С. 217.
37. Valuev L.I., Chuprov V.V., Plate N.A. // J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 1993. V. 5. № 1/2. P. 37.

## Polymeric Systems Containing Immobilized Microbial Cells and Biosensors on Their Basis (Review)

N. A. Platé and V. V. Chupov

*Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences,  
Leninskii pr. 29, Moscow, 117912 Russia*

**Abstract** – The synthesis and properties of coimmobilized systems involving a synthetic polymer and microbial cells are considered. The effects of covalent immobilization of the cells on their functional activity and reproductivity are discussed, as well as the effects that the cells show on the structure and physicochemical properties of filled polymers synthesized in the presence of intact or chemically modified photobacteria. Under certain conditions, the low-molecular-mass cell modifiers completely ruin the intracellular activity of microorganisms, whereas polymeric reactive carriers interact with the cells, leaving their intracellular elements intact. Procedures for preparation of biosensors based on immobilized photobacteria are described; these biosensors allow qualitative and quantitative identification of the impurities in aqueous media.