

УДК 577.24

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ КИСЛОРОДНЫХ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ХИТОЗАНОВОМ СОРБЕНТЕ ДЛЯ БИОИЗЪЯТИЯ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ИЗ СТОЧНЫХ ВОД

© 2022 г. С. Г. Васильева<sup>а, \*</sup>, Л. Р. Семёнова<sup>а</sup>, И. О. Селях<sup>а</sup>, О. Б. Чивкунова<sup>а</sup>, П. Н. Щербаков<sup>а</sup>, О. И. Баулина<sup>а</sup>, О. А. Горелова<sup>а</sup>, Е. С. Лобакова<sup>а, б</sup>

<sup>а</sup>Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>б</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии Наук, Москва, 127276 Россия

\*e-mail: vankat2009@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2021 г.

После доработки 19.08.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Изучена иммобилизация зеленой микроводоросли (МВ) *Micractinium* sp. NAMSU A-19 с природным комплексом ассоциированных гетеротрофных бактерий в смешанной культуре с цианобактерией (ЦБ) *Synechococcus* sp. 1Dr66E-1 на поликатионном сорбенте на основе природного полимера хитозана. Сорбент, полученный из хитозана с молекулярной массой 600 кДа методом криополимеризации с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента, обладал высоким сродством к поверхностным структурам кислородных фототрофных микроорганизмов (ОФМ) и обеспечивал прочное прикрепление клеток к поверхности сорбента. Изучение кинетики и оценка эффективности иммобилизации клеток смешанной культуры показали высокую сорбционную способность хитозанового сорбента: в течение 1 ч культивирования эффективность иммобилизации составляла в среднем 40–52%, а через 48 ч практически все клетки ОФМ находились в иммобилизованном состоянии. Высокопористый, нетоксичный и биоразлагаемый сорбент обеспечивал надежное прикрепление клеток на протяжении 7 сут культивирования, не препятствовал росту иммобилизованных клеток, как на поверхности, так и во внутренних слоях полимера. Изучение процесса иммобилизации смешанной культуры методом сканирующей электронной микроскопии показало, что клетки ЦБ и МВ с ассоциированными гетеротрофными бактериями плотно прикрепляются к поверхности хитозанового сорбента, при этом наблюдалось образование тяжёлых внеклеточного полимерного матрикса, участвующего в формировании биопленки. Иммобилизация клеток смешанной культуры ОФМ на хитозановом сорбенте была эффективна при очистке воды от нитратов и фосфатов.

**Ключевые слова:** кислородные фототрофные микроорганизмы, цианобактерии, микроводоросли, иммобилизация, полимерные материалы, сшитые хитозаны, биоизъятие биогенных элементов

**DOI:** 10.31857/S055510992201010X

Уже более полувека для очистки сточных вод используются кислородные фототрофные микроорганизмы (ОФМ), а именно микроводоросли (МВ) и цианобактерии (ЦБ). Использование ОФМ имеет огромный потенциал из-за высокой скорости поглощения биогенных элементов и способности к деструкции токсичных поллютантов [1]. Известно, что в естественных местообитаниях ОФМ существуют в составе природных сообществ МВ, ЦБ и гетеротрофных бактерий, позволяющих им успешно адаптироваться к неблагоприятным условиям среды, в том числе к избытку или недостатку питательных веществ. Для моделирования природных условий и изучения механизмов взаимодействия ЦБ и МВ в лаборатории используется метод создания смешанных культур, в которых ОФМ

культивируются совместно при различных условиях.

В настоящее время все более распространёнными становятся технологии с применением в процессах очистки сточных вод иммобилизованных ОФМ [2]. Главное преимущество иммобилизованных клеток по сравнению с использованием суспензионных культур – упрощение сбора биомассы, что является одной из ключевых проблем технологий с участием МВ и ЦБ. Известно также, что иммобилизация позволяет осуществлять культивирование микроорганизмов при большей плотности клеток и более равномерном освещении, по сравнению с суспензионными культурами, что в ряде случаев приводит к увеличению скорости протекания фотосинтеза, потребления соедине-

ний азота и фосфора из сточных вод, а также накоплению клетками ОФМ вторичных метаболитов [1]. Имобилизация клеток микроорганизмов позволяет осуществлять сложные многостадийные процессы, обуславливает лучшую защищенность клеток от воздействия различных отрицательных факторов, в том числе токсичных веществ, содержащихся в сточных водах. Основная сложность при использовании технологий с участием иммобилизованных культур заключается в выборе носителя [3]. Сорбент для иммобилизации ОФМ должен быть недорогим, нетоксичным, не препятствовать поступлению питательных веществ и эффективно освещению клеток, а также обладать высокой сорбирующей способностью [1]. В качестве природных носителей для иммобилизации ОФМ используют субстраты из плодов люфы, сфагнум, торф, полимеры из натуральных полисахаридов (агар-агар, целлюлоза, альгинаты, каррагинан, хитозан), в качестве синтетических носителей – полиакриламид, полиуретан, поливинилхлорид, полипропилен, полисульфон [2]. Биоразлагаемые и биосовместимые сорбенты на основе хитозана являются перспективными носителями для клеток ОФМ [4, 5].

Цель работы – изучение возможности применения сорбентов на основе хитозана для иммобилизации смешанной культуры, состоящей из природного комплекса МВ *Micractinium* sp. NAMSU A-19 и ассоциированных гетеротрофных бактерий, выделенных из эвтрофизированной по фосфору среды обитания, и ЦБ *Synechococcus* sp. 1Др66Е-1, выделенных из фрагментов гидроида *Dynatena pumila*.

## МЕТОДИКА

**Объекты исследования и метод культивирования.** В работе использовали альгологическую монокультуру зеленой МВ *Micractinium* sp. NAMSU A-19 (далее в тексте *Micractinium* sp.) с ассоциированными гетеротрофными бактериями, ранее выделенную из водных проб затона озера Большая Имандра в непосредственной близости от хвостохранилища апатит-нефелиновой обогатительной фабрики г. Апатиты (Россия). В качестве прокариотного ОФМ использовали аксеничную культуру ЦБ *Synechococcus* sp. 1Др66Е-1 (далее в тексте *Synechococcus* sp.), выделенную из ассоциации с гидроидным полипом *Dynatena pumila*, собранным на сублиторали Кандалакшского залива Белого моря [6]. Выращивание культур проводили в стеклянных колоннах (600 мл) при постоянном освещении (80 мкмоль квантов ФАР/м<sup>2</sup>·с), температуре 26°C и продувании стерильного атмосферного воздуха на минеральной среде BG-11 [7] с повышенным содержанием фосфора (г/л): NaNO<sub>3</sub> – 0.74, KNO<sub>3</sub> – 0.9, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.181, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.089, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.075, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0.036,

лимонная кислота – 0.006, цитрат аммония – 0.006, Na<sub>2</sub>ЭДТА·2H<sub>2</sub>O – 0.001, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 0.02, раствор микроэлементов – 1 мл) в течение 10–12 сут (до стационарной фазы роста). По окончании культивирования клетки отделяли от среды центрифугированием при 1000 g и ресуспендировали в свежей среде BG-11.

Для иммобилизации использовали сорбент на основе хитозана, полученный в лаборатории полимерных материалов НИЦ “Курчатовский институт”. При синтезе сшитого хитозанового сорбента использовался хитозан ChitoClear HQG 800 (Исландия) с молекулярной массой 600 кДа. 2%-ный водный раствор хитозана перемешивали с 2%-ной уксусной кислотой и добавляли глутаровый альдегид из расчета 1% (в/в) от веса хитозана. Лиофилизация образцов проводилась на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC с глубиной вакуума 0.250 мБар в течение 24 ч, перед извлечением образцы выдерживали в вакууме 0.001 мБар в течение 2 ч [8].

**Оценка эффективности иммобилизации смешанной культуры ОФМ на сорбенте на основе хитозана.** Иммобилизацию клеток ОФМ на сорбенте проводили в стеклянных колбах объемом 100 мл, содержащих 0.050–0.053 г сорбента в форме диска и 30 мл суспензии культур *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp., предварительно смешанных в соотношении 2 : 1 (об./об.). Перед началом эксперимента определяли общее содержание хлорофилла в смешанной культуре по методике, описанной ранее [9]. Колбы помещали на термостатируемую качалку (120 об./мин, 26°C) и инкубировали в течение 7 сут при освещении 40 мкмоль квантов ФАР/м<sup>2</sup>·с. Процесс иммобилизации оценивали по изменению остаточного содержания хлорофилла в суспензии клеток, не прикрепившихся к сорбенту, при инкубации в течение 1, 2, 4, 24, 48, 168 ч. Контролем служила смешанная культура, инкубированная в идентичных условиях, но без хитозанового сорбента.

Эффективность иммобилизации смешанной культуры для каждой длительности инкубации вычисляли по формуле:

$$\mathcal{E}_{\text{им}} = (C_{\text{хл1}} - C_{\text{хл2}}) \times 100\% / C_{\text{хл1}}, \quad (1)$$

где  $\mathcal{E}_{\text{им}}$  – эффективность иммобилизации культуры на сорбенте, %;  $C_{\text{хл1}}$  – содержание хлорофилла в контроле (без сорбента), мг/л;  $C_{\text{хл2}}$  – остаточное содержание хлорофилла в суспензии клеток в присутствии сорбента, мг/л.

**Оценка соотношения *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp. в составе смешанной культуры в процессе и по окончании иммобилизации.** О соотношении ЦБ и МВ в составе смешанной культуры судили по спектрам поглощения суспензии клеток, вычисляя отношение уровней поглощения в области основных максимумов цианобактериального

фиикоцианина (630 нм) и хлорофилла *a* (680 нм) ЦБ и МВ. По окончании инкубации (через 7 сут), клетки смешанной культуры десорбировали с поверхности носителя путем механического разрушения сорбента и последующего отделения его остатков от клеток смешанной культуры фильтрованием через сетчатый нейлоновый фильтр с диаметром пор 20 мкм. Соотношение величин поглощения при 630 и 680 нм суспензий десорбированной смешанной культуры сравнивали со значениями в контроле.

**Изучение особенностей прикрепления клеток смешанной культуры методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).** Фрагменты сорбента с иммобилизованными на них клетками из смешанной культуры фиксировали 2%-ным раствором глутарового альдегида, приготовленного на 0.1 М какодилатном буфере с рН=7.2 в течение 1 ч, затем обезвоживали в водных растворах этанола возрастающей концентрации (от 10 до 100%) и помещали на ночь в 100%-ный ацетон. Образцы высушивали при критической точке на установке “DryerHCP-2” (“Hitachi”, Япония), напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке “IB-3 IonCoater” (“Eiko”, Япония) и исследовали с помощью сканирующего микроскопа JSM-6380LA (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 15 Кв и инструментальном увеличении 60–20000.

**Изучение биоизъятия фосфатов и нитратов иммобилизованными на хитозане клетками смешанной культуры.** Суспензии клеток *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp. смешивали в соотношении 2:1 (об./об.). Перед смешиванием плотность суспензий монокультур, определяемая по оптической плотности (ОП) при 680 нм, составляла 0.3 опт. ед. В стеклянные колбы на 250 мл вносили 80 мл суспензии смешанной культуры и 3 образца сорбента массой 0.050–0.053 г в форме диска. Колбы помещали на термостатированную качалку (120 об./мин, 26°C) и инкубировали в течение 8 сут при освещении 40 мкмоль квантов ФАР/м<sup>2</sup>·с. Контролем служила смешанная культура, которую инкубировали в идентичных условиях, но без хитозанового сорбента. Перед началом эксперимента, а также через 1 и 8 сут отбирали по 3 мл суспензии клеток смешанной культуры, инкубированной с хитозаном и без, затем клетки отделяли от среды центрифугированием при 3000 g. Остаточную концентрацию фосфатов и нитратов в среде оценивали методом ионно-обменной хроматографии на хроматографе Thermo Dionex ICS 1600 HPLC (“Thermo Fisher Scientific Inc”, США) с анионной аналитической колонкой IonPac AS12A.

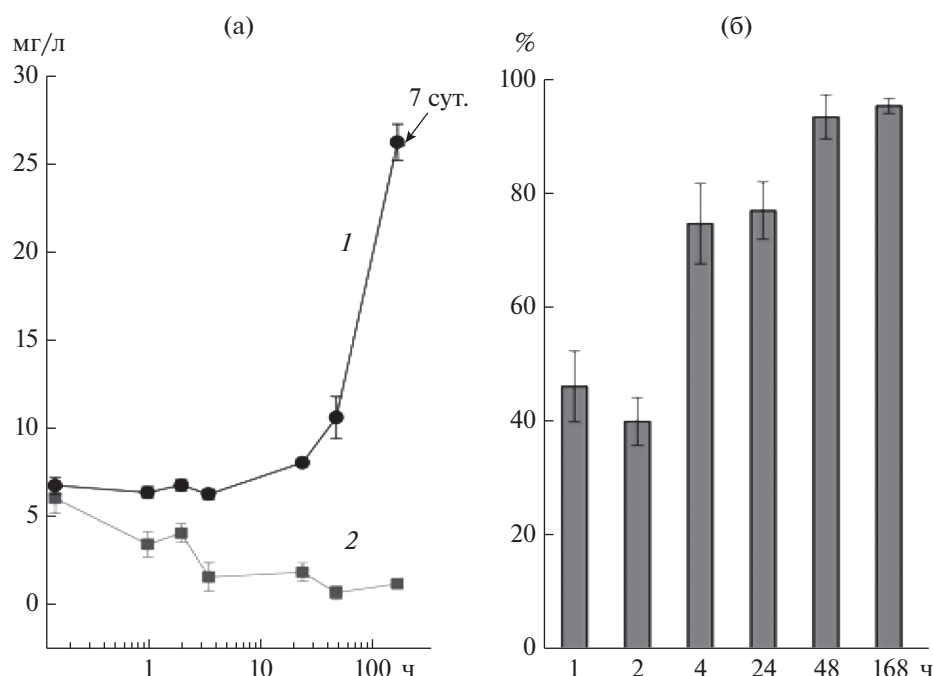
**Статистическая обработка полученных результатов.** Представлены результаты двух независимых экспериментов, каждый вариант в трех биологических повторностях. На рисунках представлены

средние значения и соответствующие стандартные отклонения.

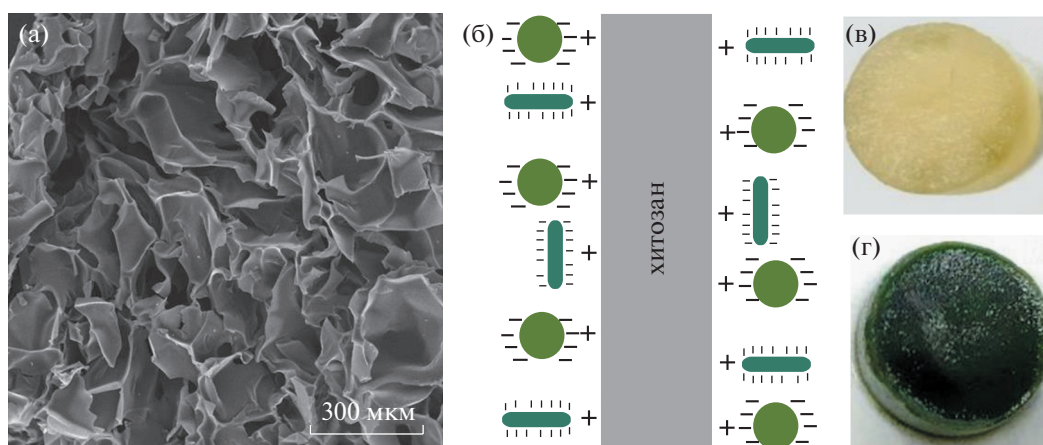
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При иммобилизации смешанной культуры через 1 ч после погружения хитозанового диска в суспензию наблюдали снижение содержания хлорофилла в суспензии по сравнению с контролем, указывающее на прикрепление значительной доли клеток ОФМ к поверхности хитозанового диска (рис. 1а). Рассчитанная по формуле (1) эффективность иммобилизации варьировала в пределах 40–52%, что свидетельствовало о высокой сорбционной способности испытываемого сорбента на основе хитозана (рис. 1б). В течение 4 ч культивирования более 70% клеток в суспензии сорбировались на хитозане, однако в дальнейшем скорость иммобилизации клеток снижалась. Через 48 ч практически все клетки находились в иммобилизованном состоянии, а рассчитанная эффективность иммобилизации составила 92–97%. Сравнение эффективности иммобилизации смешанной культуры *Micractinium* sp., *Synechococcus* sp. и исследованной нами ранее монокультуры *Lobosphaera* sp. NAMSU 925/2 [10] показало, что тестируемый сорбент проявлял более высокую способность к сорбции исследованной нами смешанной культуры. Несмотря на окончание процесса иммобилизации в течение 2 сут, инкубация была продолжена до 7 сут для оценки прочности прикрепления клеток, их способности к росту и развитию, а также влияния иммобилизации на соотношение клеток ОФМ в смешанной культуре. Известно, что одним из главных недостатков метода пассивной (адсорбционной) иммобилизации клеток микроорганизмов на поверхности различных природных и синтетических носителей является обратимость процесса [1]. Сорбированные на носителе клетки могут легко освободиться с его поверхности, переходя в суспензию, что затрудняет культивирование и последующий сбор биомассы. Следует отметить, что в эксперименте на протяжении 7 сут мы не наблюдали десорбции клеток смешанной культуры с поверхности полимера, что свидетельствует о существенном преимуществе его использования по сравнению с другими известными носителями [1, 2].

Исследуемый сорбент (рис. 2а) был получен путем сшивания хитозана с молекулярной массой 600 кДа глутаровым альдегидом (рис. 2б) методом криополимеризации [8] и обладал высокопористой структурой. Благодаря наличию значительного количества пор размером от 50 до 200 мкм (рис. 2а), сорбент на основе сшитого хитозана характеризовался большой площадью поверхности, поэтому мог адсорбировать и надежно удерживать значительное количество клеток микроорганизмов (рис. 2г). На первом этапе клетки исследу-



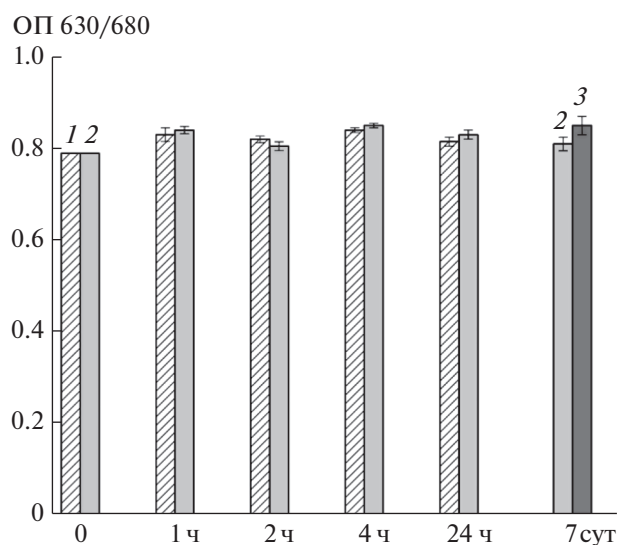
**Рис. 1.** Кинетика иммобилизации на сорбенте на основе хитозана (а) смешанной культуры *Microactinium* sp. NAMSU A-19 и *Synechococcus* sp. 1Др66Е-1 и ее эффективность (б, %): содержание хлорофилла (мг/л) в контроле ОФМ (1) и ОФМ + хитозан (2).



**Рис. 2.** Микрофотография (СЭМ) поверхности сорбента на основе хитозана (а), схема взаимодействия ЦБ (палочки) и МВ (круги), несущих отрицательно заряженные фосфатные, карбоксильные и тиоловые группы поверхностных клеточных структур, с поверхностью сорбента, несущего положительно заряженные аминокислотные группы (б), образец сорбента в форме диска до иммобилизации на нем клеток ОФМ (в), образец сорбента после культивирования с клетками ОФМ в течение 7 сут (г).

дуемой смешанной культуры прикреплялись к поверхности пористого сорбента, а затем диффундировали по системе сообщающихся пор во внутренние полости. При этом клетки смешанной культуры сохраняют способность к активному росту и делению, подтверждаемым видимым увеличением количества иммобилизованной биомассы клеток (рис. 2д).

Известно, что сорбент на основе природного поликатионита хитозана обладал высоким сродством к поверхностным структурам клеток ОФМ, так как положительно заряженные аминокислотные группы на поверхности полимера могут электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами в составе наружной мембраны ЦБ, а также с карбоксильными и тио-



**Рис. 3.** Отношение ( $OP_{630}/OP_{680}$ ) максимумов поглощения фикоцианина ЦБ (630 нм) и суммарного хлорофилла *a* МВ и ЦБ (680 нм) в суспензии смешанной культуры, инкубируемой в присутствии сорбента (1) и без него (2, контроль). На 7 сут показано отношение оптической плотности для десорбированной смешанной культуры (3).

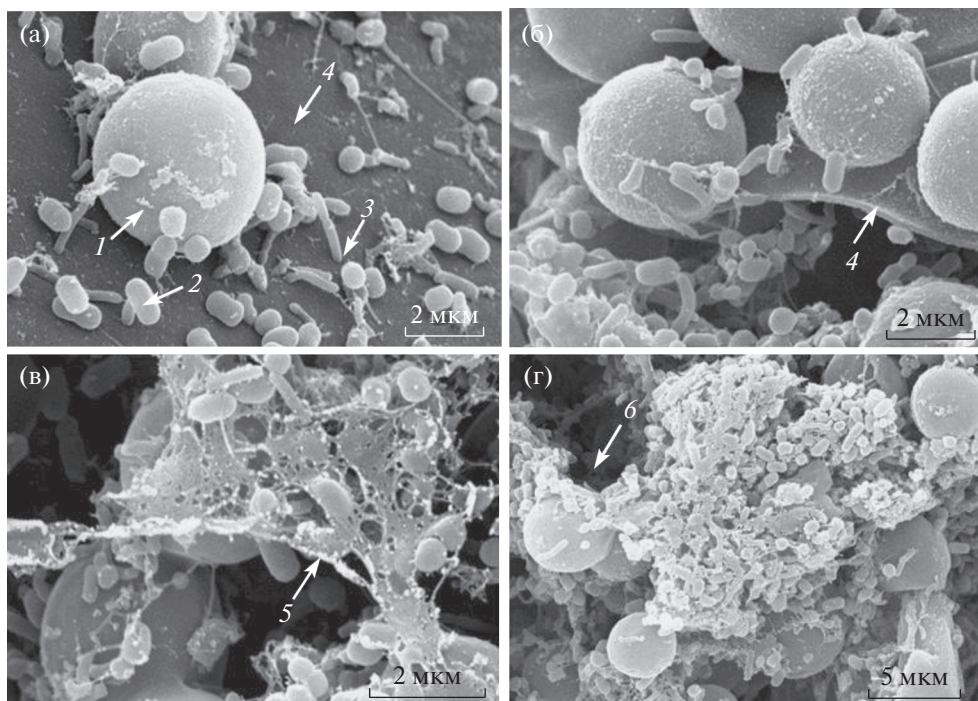
ловыми группами полисахаридов, белков и полипептидов, входящими в состав поверхностных структур клеток МВ и ЦБ (рис. 2в) [10, 11]. В водных растворах хитозановые сорбенты были способны к образованию многочисленных межмолекулярных водородных связей, за счет чего прочность связывания их с клеточными стенками микроорганизмов увеличивалась, а комплексы не разрушались даже при экстремальных изменениях рН и ионной силы среды [11].

В ходе иммобилизации проводили оценку соотношения *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp. в суспензии не прикрепившихся к сорбенту клеток и сравнивали с их соотношением в смешанной культуре, инкубированной без носителя. В течение первых 48 ч эксперимента соотношение ОП при максимумах поглощения фикоцианина ЦБ (630 нм) и суммарного хлорофилла *a* МВ и ЦБ (680 нм) в суспензии клеток, не прикрепившихся к сорбенту, и суспензии клеток в контроле значительно не различалась (рис. 3). Следовательно, можно предположить, что клетки МВ и ЦБ сорбировались с одинаковой эффективностью. После 7 сут инкубирования смешанной культуры в присутствии сорбента, соотношение ОП при 630 и 680 нм в суспензии клеток, десорбированных из хитозанового диска, и суспензии клеток в контроле отличалось незначительно, поэтому можно предположить, что иммобилизация на полимере на основе хитозана не оказывала существенного влияния на состав смешанной культуры (рис. 3).

Исследование сорбента с иммобилизованной смешанной культурой проводили с применением метода СЭМ (рис. 4). Одноклеточная ЦБ *Synechococcus* sp. не образовывала слизистых чехлов и была представлена клетками в форме палочек, длиной 1.5–2.0 мкм и диаметром 0.6–0.8 мкм [12], а одноклеточная МВ *Micractinium* sp. – сферическими клетками размером 2–3 мкм. Эти характеристики ОФМ (рис. 4а) соответствуют клеткам МВ и ЦБ на поверхности сорбента. Одновременно выявляются бактерии разных морфотипов (кокки, короткие и длинные палочки разного диаметра), возможно, первоначально ассоциированные с МВ. Как видно на рис. 4а ЦБ и гетеротрофные бактерии прикреплены к сорбенту преимущественно не ориентировано. Однако некоторые клетки ЦБ и большинство тонких длинных палочек бактерий прикрепляются полярным концом клетки перпендикулярно к поверхности сорбента. Одиночные клетки ЦБ, МВ и ассоциированных бактерий, а также их скопления обнаружены на внешней поверхности, в поровых каналах и в складчатых структурах сорбента (рис. 4б).

На поверхности и в поровых каналах полимера на основе хитозана, кроме того, наблюдается формирование внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) в виде тяжей, которые объединяют всех участников иммобилизованного сообщества (рис. 4в). На микрофотографии (рис. 4г) видно, что клетки *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp., активно заселяя поверхность сорбента, образуют на некоторых участках плотный слой агрегированных клеток, в котором представлены оба фототрофных компонента смешанной культуры. Известно, что продукция ВПМ является одним из ключевых этапов в формировании биопленки, образование которой подтверждается наличием крупных смешанных клеточных агрегатов, прикрепленных к поверхности хитозана, каналов, являющихся необходимой частью структуры биопленки (рис. 4г) [13]. Входящие в состав ВПМ компоненты (экзополисахариды, белки, аминокислоты) способствуют увеличению прочности связывания сообществ микроорганизмов с различными твердыми поверхностями [14] благодаря адгезионному взаимодействию. При иммобилизации ОФМ на поликатионном сорбенте на основе хитозана, электростатическое взаимодействие, возникающее между свободными аминокислотными группами на поверхности сорбента и карбоксильными группами кислых полисахаридов, входящих в состав ВПМ, способствует еще более прочному связыванию агрегатов клеток с поверхностью носителя, обеспечивая практически необратимую иммобилизацию.

Наряду с изучением сорбционной эффективности полимера на основе хитозана было исследовано влияние иммобилизации на процесс поглощения биогенных элементов клетками ОФМ. Результаты сравнения эффективности биоизъятия

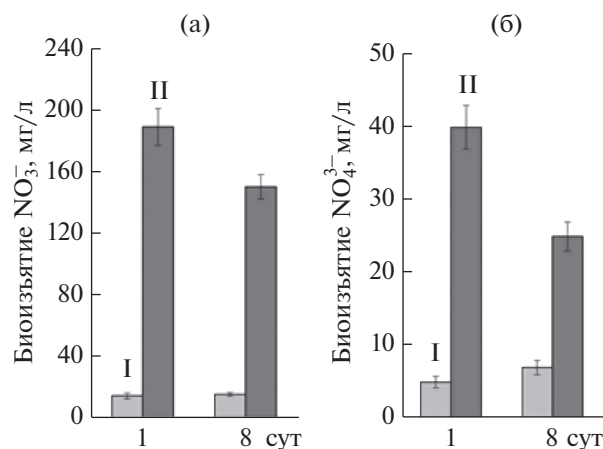


**Рис. 4.** СЭМ изображения иммобилизованных клеток смешанной культуры ЦБ *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 и МВ *Micractinium* sp. NAMSU A-19 с ассоциированными гетеротрофными бактериями на поверхности хитозанового сорбента (а, б), сопровождаемое образованием полимерного матрикса (в) и биопленки (г): 1 – клетки МВ *Micractinium* sp., 2 – клетки ЦБ *Synechococcus* sp., 3 – клетки гетеротрофной бактерии в форме палочки, прикрепленной апикально к поверхности сорбента, 4 – сорбент на основе хитозана, 5 – тяжи ВПМ, 6 – каналы биопленки, прикрепленной к поверхности сорбента.

нитратов и фосфатов клетками свободной и иммобилизованной на хитозане смешанной культуры *Synechococcus* sp. и *Micractinium* sp. представлены на рис. 5. В 1 сут эксперимента количество, как поглощенных нитратов, так и фосфатов иммобилизованными и свободными клетками смешанной культуры практически не отличалось. В течение следующих 7 сут скорость изъятия биогенных элементов клетками смешанной культуры ЦБ и МВ значительно возросла, при этом эффективность поглощения нитратов и фосфатов у иммобилизованных клеток была выше, чем у свободных. Так после окончания эксперимента клетки смешанной культуры, иммобилизованной на хитозановых дисках, поглотили  $189 \pm 11$  мг/л нитратов и  $40 \pm 3$  мг/л фосфатов, тогда как свободные клетки  $150 \pm 8$  мг/л нитратов и  $25 \pm 2$  мг/л фосфатов.

Увеличение эффективности изъятия биогенных элементов клетками ОФМ, иммобилизованных на различных природных носителях, описано в ряде работ [1, 2, 5, 10] и объясняется увеличением метаболической активности МВ и ЦБ, изменением микроокружения клеток. Известно также, что иммобилизованные культуры более устойчивы к изменениям pH, температуры, ионной силы среды [2, 5]. Основным преимуществом

сшитых хитозановых сорбентов в сравнении с другими природными полимерами является их высокая механическая прочность и эффективность иммобилизации клеток [10]. Одним из перспективных способов применения биodeградируемых, нетоксичных полимеров на основе хитоза-



**Рис. 5.** Биоизъятие нитратов (а) и фосфатов (б) свободными (I) и иммобилизованными клетками (II) смешанной культуры *Micractinium* sp. NAMSU A-19 и *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 при культивировании в модифицированной среде BG-11 в течение 1 и 8 сут.

на является их использование в процессе очистки сточных вод от биогенных элементов, позволяющее получать обогащенную биодоступными формами азота и фосфора биомассу ОФМ и использовать ее в качестве удобрения.

Таким образом, сорбент на основе хитозана с молекулярной массой 600 кДа обладал высокой сорбирующей способностью в отношении смешанной культуры *Synechococcus* sp. и *Micractinium* sp. с ассоциированными гетеротрофными бактериями. Поликатионный сорбент надежно удерживал клетки ОФМ как на поверхности, так и во внутренних слоях полимера, не препятствуя их росту и делению. В течение 7 сут культивирования клетки смешанной культуры практически необратимо прикреплялись к поверхности полимера, при этом наблюдалось формирование ВПМ, который объединяет все компоненты образующейся на носителе биопленки. Имобилизация клеток смешанной культуры ОФМ на хитозановом сорбенте способствует увеличению эффективности биоизъятия нитратов и фосфатов клетками. Таким образом, сорбент на основе хитозана может быть успешно использован для имобилизации ассоциаций и смешанных культур ОФМ с целью применения в различных областях фотобиотехнологии, в том числе для очистки сточных вод и биоизъятия биогенных элементов.

Работа по культивированию ОФМ, изучению методом СЭМ и синтез сорбентов выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-25050) с использованием оборудования ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова и лаборатории полимерных материалов НИЦ “Курчатовский институт”.

Работа по изучению эффективности имобилизации ОФМ выполнена при финансовой поддержке Мегагранта правительства РФ (соглашение № 075-15-2019-1882).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Moreno-Garrido I.* // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. № 10. P. 3949–3964.
2. *De-Bashan L.E., Bashan Y.* // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. № 6. P. 1611–1627.
3. *Hameed M.S.A., Ebrahim O.H.* // *J. Agric. Biol.* 2007. V. 9. № 1. P. 183–192.
4. *Fierro S., Sanchez-Saavedra M., Copalca C.* // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. P. 1274–1279.
5. *Eroglu E., Agarwal V., Bradshaw M., Chen X., Smith S., Raston S., Iyer K.* // *Green Chem.* 2012. V. 14. P. 2682–2685.
6. *Gorelova O.A., Kosevich I.A., Baulina O.I., Fedorenko T.R., Torshkheeva A.Z., Lobakova E.S.* // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2009. V. 64. P. 16–22.
7. *Stanier R., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G.* // *Bacteriol. Rev.* 1971. V. 35. № 2. P. 171.
8. *Romanova O.A., Grigor'ev T.E., Goncharov M.E., Rudyak S.G., Solov'yova E.V., Krashenninnikov V.P., Saprykin E.V., Sytina S.N., Chvalun M.A., Pal'tsev S.T., Pantelev A.A.* // *B. Exp. Biol. Med.* 2015. V. 159. № 4. P. 557–566.
9. *Solovchenko A., Merzlyak M., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S.* // *J. Phycol.* 2010. V. 46. № 4. P. 763–772.
10. *Vasilieva S., Lobakova E., Grigoriev T., Selyakh I., Semenova L., Chivkunova O., Gotovtsev P., Antipova C., Zagoskin Y., Scherbakov P., Lukyanov A., Lukanina K., Solovchenko A.* // *J. Water Process Eng.* 2021. V. 40. P. 101774.
11. *Синицын А., Райнина Е., Лозинский В., Снасов С.* Имобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Издательство МГУ, 1994. 288 с.
12. *Koksharova O.A., Kravzova T.R., Lazebnaya I.V., Gorelova O.A., Baulina O.I., Lazebny O.E., Fedorenko T.A., Lobakova E.S.* // *BioMed Research International.* 2013. V. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/760681>
13. *Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К.* // *Микробиол.* 2015. V. 84. № 6. P. 623–644.
14. *Tosteson T.R., Revuelta R., Zaidi B.R., Imam S.H., Bard R.F.* // *J. Colloid Interface Sci.* 1985. V. 104. № 1. P. 60–71.

## Immobilization of a Mixed Culture of Oxygenic Phototrophic Microorganisms on a Chitosan-Based Sorbent for Nutrient Bioremoval

S. G. Vasilieva<sup>1, \*</sup>, L. R. Semenova<sup>1</sup>, I. O. Selyakh<sup>1</sup>, O. B. Chivkunova<sup>1</sup>, P. N. Shcherbakov<sup>1</sup>, O. I. Baulina<sup>1</sup>, O. A. Gorelova<sup>1</sup>, and E. S. Lobakova<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> *Biological Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

<sup>2</sup> *Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia*

\*e-mail: [vankat2009@mail.ru](mailto:vankat2009@mail.ru)

The immobilization of cells of a mixed culture of microalgae (MB) *Micractinium* sp. NAMSU A-19 and cyanobacteria (CB) *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 on chitosan-based polymer was studied. The polycationic sorbent based on a natural chitosan polymer with a molecular weight of 600 kDa, obtained by crosslinking chitosan with glutaraldehyde by cryopolymerization, has a high affinity for the surface structures of oxygenic phototrophic microorganisms (OPM) and provides a strong attachment of cells to the surface of the sorbent. The study of the kinetics and evaluation of the effectiveness of mixed culture immobilization showed a high

sorption capacity of the chitosan sorbent, as during the 1st hour of cultivation the immobilization efficiency was on average 40–52%, and after 48 h, almost all cells were immobilized. The highly porous, non-toxic and biodegradable sorbent provided steady cell attachment during 7 days of cultivation, and did not affect the growth of immobilized mixed culture, both on the surface and in the inner layers of the polymer. The study of mixed culture immobilization by scanning electron microscopy showed that CB and MB cells are tightly attached to the surface of the chitosan sorbent, followed by formation of strands of the extracellular polymer matrix and biofilm, consisting of cells of the mixed culture of MB and CB, as well as heterotrophic bacteria associated with *Micractinium* sp. Immobilization on a chitosan sorbent contributes the increasing of nitrates and phosphates bioremoval by tested mixed culture.

*Keywords:* oxygenic phototrophic microorganisms, cyanobacteria, microalgae, immobilization, polymer materials, cross-linked chitosan, nutrient bioremoval