

НАПРАВЛЕННОЕ ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ ЦЕЛЫХ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ В ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯТОВ КРЕМНИЯ И ТИТАНА

Е.С. Филиппова, Д.Г. Лаврова

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

Применение свободных бактерий в промышленных биотехнологических процессах имеет ряд существенных ограничений. Так, они чувствительны к неблагоприятным условиям (механическим воздействиям, колебаниям рН и температуры), что снижает их эффективность и продуктивность; высокая плотность клеточной суспензии может приводить к агломерации и неравномерному распределению в реакторе, из-за чего происходит ухудшение массообмена и доступа субстрата [1]. Иммунизация микроорганизмов позволяет повысить стабильность клеток, облегчить отделение биомассы от целевого продукта, снизить стоимость биопроцессов за счет применения таких биокатализаторов в нескольких циклах и служит фундаментальной предпосылкой для масштабирования производства [2]. Инкапсуляция в гидрогели наряду с другими методами иммобилизации обладает ключевыми преимуществами. Гели на основе природных и синтетических полимеров, таких как альгинат [3,4], агар, полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт, (ПВС) [5], силикагели [6] и полиакриламид создают трехмерную пористую структуру, которая не только удерживает клетки, но и обеспечивает эффективный массообмен, позволяя субстратам и продуктам реакции свободно диффундировать [7]. Важным преимуществом является возможность точного контроля свойств гелевой матрицы (пористости, механической прочности, гидрофильности) для оптимизации условий иммобилизации определенных микроорганизмов [8]. Использование золь-гель технологии давно вызывает интерес как доступный способ стабилизации биокатализаторов [9–11]. Однако основными ограничениями для иммобилизации связаны с выделением спиртов, усадкой при сушке и далеко не нейтральные значения рН для прохождения синтеза. Это послужило стимулом для разработки стратегий, направленных на формирование неорганических частиц у поверхности клеток при участии органических структурообразующих гидрогелей. Так, полиолатные соединения кремния и титана сочетают в себе преимущества алкоксидов и органических компонентов и являются перспективным материалов в качестве матрицы для иммобилизации целых клеток микроорганизмов.

В работе исследовали возможность направленного инкапсулирования целых клеток бактерий различного типа в гидрогели на основе полиэтиленгликолятов кремния (Si-ПЭГ) и титана (Ti-ПЭГ), полученные и любезно предоставленные научной группой под руководством д.х.н. Хониной Т.Г. (Институтом органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН). Объектами инкапсулирования выбраны грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* MG1655 (*E. coli* MG1655) и грамположительные бактерии *Rhodococcus qingshengii* X5 (*R. qingshengii* X5). Выбор *E. coli* MG1655 обусловлен их широким использованием в качестве основной модельной системы для генетических исследований [12], получения рекомбинантных белковых молекул [13]. Возможность перенаправления метаболических путей бактерий позволяет использовать ее в методах очистки окружающей среды, производства биотоплива. *R. qingshengii* способны к утилизации широкого спектра органических соединений, среди которых алканы, ароматические углеводороды, а также их производные [14]. Помимо деградации поллютантов эти бактерии способны к синтезу различных практически значимых соединений, в число которых входят антибиотики [15], а также каротиноиды, фенилпропаноиды (куркумин А, В) [16], сидерофоры, биосурфактанты [17]. Особое значение в выборе объектов имеют различия в строении клеточных стенок этих микроорганизмов: грамотрицательный *E. coli* с липополисахаридной мембраной и грамположительный *R. qingshengii* с толстым пептидогликановым слоем и миколовыми кислотами, возможно, по-разному будет взаимодействовать с гидрогелем, что повлияет функциональные характеристики биокатализаторов.

Определение эффективности инкапсулирования проводили путем посева свободных и иммобилизованных в гидрогели клеток на питательную среду LB и последующего инкубирования в термостате в течении 2 суток. Эффективность инкапсуляции рассчитывали по формуле 1:

$$\text{ЭИ, \%} = \frac{\lg N}{\lg N_0} \times 100 \quad (1)$$

где N – количество живых клеток, высвободившихся из инкапсулированных гидрогелей, N_0 – количество свободных клеток до инкапсуляции.

Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность инкапсулирования целых клеток бактерий

Клетки	Свободные клетки, КОЕ/мл	Si-ПЭГ, КОЕ/мл	ЭИ (Si-ПЭГ), %	Ti-ПЭГ, КОЕ/мл	ЭИ (Ti-ПЭГ), %
<i>E. coli</i> MG1655	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(2 \pm 1) \times 10^7$	72	$(3 \pm 1) \times 10^5$	54
<i>R. qingshengii</i> X5	$(3 \pm 1) \times 10^9$	$(2 \pm 1) \times 10^7$	77	$(4 \pm 2) \times 10^4$	50

При сравнении полученных результатов можно выделить, что степень инкапсуляции в гидрогель Si-ПЭГ не менее 70%, а в гидрогель Ti-ПЭГ — около 50%. В первую очередь это может быть связано с антимикробными свойствами аморфного диоксида титана. Антимикробная активность TiO_2 реализуется за счет его положительно заряженной поверхности, а оболочка микроорганизмов заряжена отрицательно. При контакте поверхностей между собой возникает деполаризация, за счет чего нарушается барьерная функция мембраны. Молекулярные мишени — мембран-связанные белки, липополисахариды (грам-), липотейхоевые кислоты (грам+). Адгезия к поверхности может сопровождаться возникновением механических напряжений и образованием микропор в мембране, что приводит к нарушению функций натрий-калиевого насоса, а как следствие — ионного равновесия, и клетка постепенно погибает [18].

Каталитическую активность микроорганизмов можно определяли по содержанию аденозинотрифосфата (АТФ) в пробе. При биолюминисцентном методе АТФ извлекается из клеток посредством их лизиса, а затем вступает в реакцию с люциферин и в присутствии фермента люциферазы и ионов Mg^{2+} (рисунок 1).

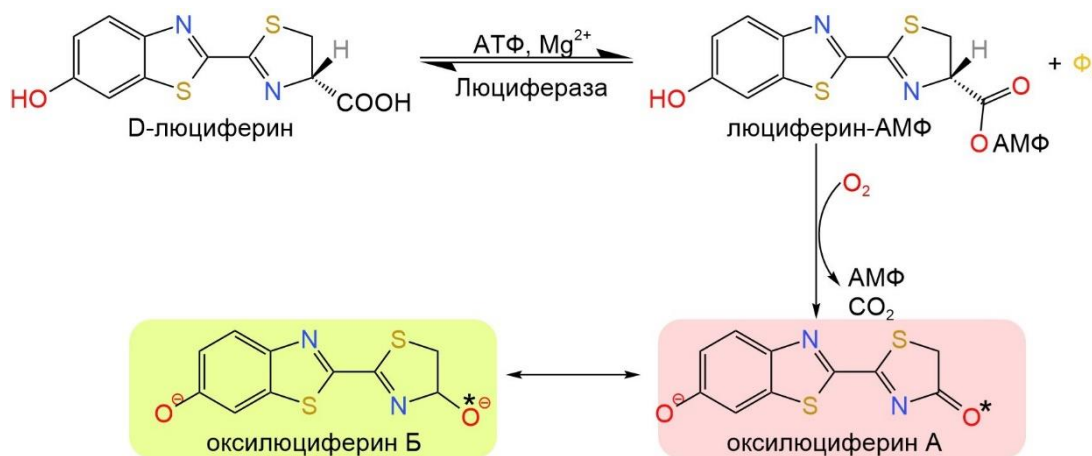


Рисунок 1. Принцип биолюминисцентного метода определения АТФ

Для свободных и инкапсулированных клеток бактерий фиксировали два параметра: интенсивность и время свечения микробной суспензии (рисунок 2). Анализ проводили до тех пор, пока значения интенсивности свечения не достигнет значения контрольного образца. Свободные и инкапсулированные клетки не люминесцируют без добавления специальных реагентов, поэтому результаты не искажены дополнительными свечениями.

Свободные бактерии характеризуются самой высокой интенсивностью и длительностью свечения, что обусловлено большим количеством живых клеток и беспрепятственной экстракции молекул АТФ. Для иммобилизованных клеток в гидрогели на основе Si-ПЭГ интенсивность свечения снижается на 7% и 16% для *R. qingshengii* и *E. coli*, соответственно. Время свечения для *R. qingshengii* остается практически неизменным, а для кишечной палочки снижается в 2 раза. Для клеток

в гидрогелях на основе титана интенсивность свечения составила 5% от свечения свободных клеток, время свечения составило 10 и 15 минут для *R. qingshengii* и *E. coli*, соответственно. Такие низкие результаты могут быть обусловлены токсичными эффектами диоксида титана, который образуется в результате золь-гель процесса. Бактерии оказываются в состоянии окислительного стресса [18], в результате которого генерируются внутриклеточные активные формы кислорода, вызывающие деструктивные эффекты внутри клетки, окисление внутриклеточного кофермента А и перекисное окисление большого количества липидов, что приводит к снижению дыхательной активности и гибели клеток.

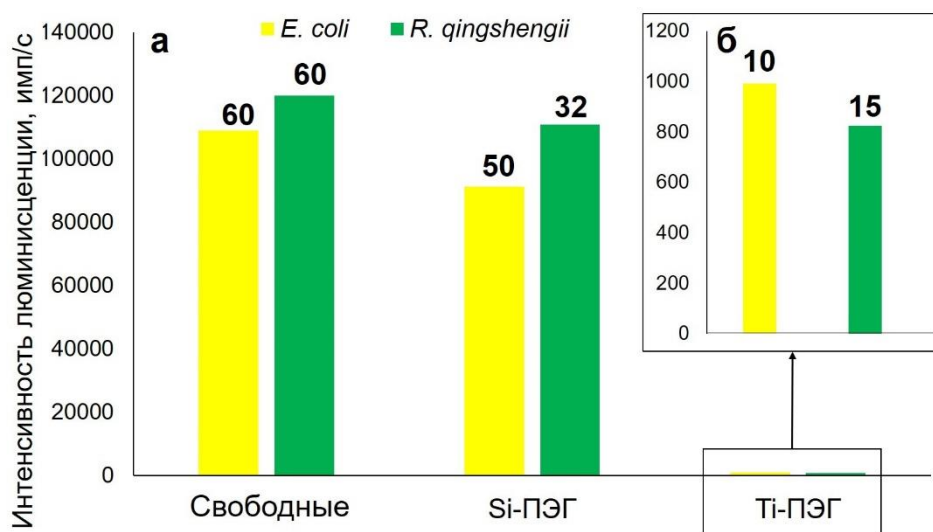


Рисунок 2. Диаграмма интенсивности свечения свободных микроорганизмов и микроорганизмов, инкапсулированных в гидрогели на основе Si-ПЭГ (а), инкапсулированных в Ti-ПЭГ (б)

Ввиду антимикробного действия гидрогеля на основе Ti-ПЭГ дыхательную активность изучали только для инкапсулированных бактерий в гидрогели из Si-ПЭГ. Оценку проводили с применением биосенсорного подхода с помощью кислородного электрода типа Кларка. Параметры чувствительности и стабильности биосенсоров на основе биокатализаторов приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристики биосенсоров на основе биокатализаторов – иммобилизованных бактерий в полиолсодержащие гидрогели кремния

Характеристики	<i>E.coli</i> MG1655	<i>R. qingshengii</i> X5
Диапазон определяемых концентраций, ммоль/л	1-21	1-20
Коэффициент чувствительности, $\text{мгO}_2 \times \text{мин}^{-1} \times \text{ммоль}^{-1}$	0.116±0,002	0.068±0,002
Относительное стандартное отклонение, %	13	4
Долговременная стабильность, дни	9	8

Коэффициент чувствительности сенсора на основе биокатализатора Si-ПЭГ/*E.coli* MG1655 практически в 2 раза превосходит сенсор на основе Si-ПЭГ/*R. qingshengii* X5. Биосенсоры способны определять содержание глюкозы в широком диапазоне концентраций и в течении почти 10 дней.

Полученные результаты демонстрируют, что гидрогели на основе Si-ПЭГ демонстрирует ключевые преимущества перед традиционными гелями, такими как альгинат и хитозан, обеспечивая оптимальную инкапсуляцию бактерий. В отличие от альгинатных систем, которые показывают высокую эффективность (74–90%), но подвержены биодegradации из-за ферментативного расщепления бактериями [19-20], Si-ПЭГ сохраняет структурную стабильность, предотвращая неконтролируемое разрушение. Хитозан, несмотря на хорошие барьерные свойства, часто снижает жизнеспособность клеток (34–67%) из-за потенциальной токсичности [21], тогда как Si-ПЭГ

полностью биосовместим. При этом Si-ПЭГ обеспечивает сопоставимую с альгинатом эффективность инкапсуляции (72–77%) для различных штаммов, включая *E. coli* и *R. qingshengii*, и превосходит Ti-ПЭГ на 18–27%. Таким образом, гидрогель Si-ПЭГ сочетает в себе лучшие свойства альгината (высокую эффективность) и хитозана (механическую прочность), исключая их недостатки, что делает их идеальными для долговременных бактериальных систем.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20032, <https://rscf.ru/project/24-24-20032/> и правительства Тульской области

Литература

1. Berillo D., Malika T., Baimakhanova B.B. et al. An Overview of Microorganisms Immobilized in a Gel Structure for the Production of Precursors, Antibiotics, and Valuable Products // *Gels*. 2024. Vol. 10. № 10. 646. doi: 10.3390/gels10100646
2. Bouabidi Z.B., El-Naas M.H., Zhang Z. Immobilization of Microbial Cells for the Biotreatment of Wastewater: A Review // *Environmental Chemistry Letters*. 2019. Vol. 17. P. 241–257. doi: 10.1007/s10311-018-0795-7
3. Colin C., Akpo E., Perrin A. et al. Encapsulation in Alginates Hydrogels and Controlled Release: An Overview // *Molecules*. 2024. Vol. 29. № 11. 2515. doi: 10.3390/molecules29112515
4. Li Y., Feng C., Li J. et al. Construction of Multilayer Alginate Hydrogel Beads for Oral Delivery of Probiotics Cells // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. Vol. 105. P. 924–930. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.124
5. Corona-Escalera A.F., Tinajero-Díaz E., García-Reyes R.A. et al. Enzymatic Cross-linked Hydrogels of Gelatin and Poly(Vinyl Alcohol) Loaded with Probiotic Bacteria as Oral Delivery System // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14. № 12. 2759. doi: 10.3390/pharmaceutics14122759
6. Sakkos J.K., Mutlu B.R., Wackett L.P. et al. Adsorption and Biodegradation of Aromatic Chemicals by Bacteria Encapsulated in a Hydrophobic Silica Gel // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017. Vol. 9. № 32. P. 26848–26858. doi: 10.1021/acsami.7b06791
7. Foudazi R., Zowada R., Manas-Zloczower I. et al. Porous Hydrogels: Present Challenges and Future Opportunities // *Langmuir*. 2023. Vol. 39. № 6. P. 2092–2111. doi: 10.1021/acs.langmuir.2c02253
8. Ungureanu C., Răileanu S., Zgârian R. et al. State-of-the-Art Advances and Current Applications of Gel-Based Membranes // *Gels*. 2024. Vol. 10. № 1. 39. doi: 10.3390/gels10010039
9. Shchipunov Y. Biomimetic Sol–Gel Chemistry to Tailor Structure, Properties, and Functionality of Bionanocomposites by Biopolymers and Cells // *Materials*. 2024. Vol. 17. № 1. 224. doi: 10.3390/ma17010224
10. Bah M.G., Bilal H.M., Wang J. Fabrication and Application of Complex Microcapsules: A Review // *Soft Matter*. 2020. Vol. 16. P. 570–590. doi: 10.1039/C9SM01634A
11. Green L.J., Bhatia N.D., Toledano O. et al. Silica-Based Microencapsulation Used in Topical Dermatologic Applications // *Archives of Dermatological Research*. 2023. Vol. 315. P. 2787–2793. doi: 10.1007/s00403-023-02725-z
12. Croxen M.A., Finlay B.B. Molecular Mechanisms of *Escherichia coli* Pathogenicity // *Nature Reviews Microbiology*. 2010. Vol. 8. P. 26–38. doi: 10.1038/nrmicro2265
13. Blount Z.D. The Unexhausted Potential of *E. coli* // *eLife*. 2015. Vol. 4. e05826. doi: 10.7554/eLife.05826
14. Pacwa-Płociniczak M., Czapla J., Płociniczak T. et al. The Effect of Bioaugmentation of Petroleum-Contaminated Soil with *Rhodococcus erythropolis* Strains on Removal of Petroleum from Soil // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. Vol. 169. P. 615–622. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.081
15. Kitagawa W., Tamura T. Three Types of Antibiotics Produced from *Rhodococcus erythropolis* Strains // *Microbes and Environments*. 2008. Vol. 23. № 2. P. 167–171. doi: 10.1264/jsme2.23.167
16. Afordoanyi D.M., Akosah Y.A., Shnakhova L. et al. Biotechnological Key Genes of the *Rhodococcus erythropolis* MGMM8 Genome: Genes for Bioremediation, Antibiotics, Plant Protection, and Growth Stimulation // *Microorganisms*. 2023. Vol. 12. № 1. 88. doi: 10.3390/microorganisms12010088
17. Hu X., Qiao Y., Chen L.-Q. et al. Enhancement of Solubilization and Biodegradation of Petroleum by Biosurfactant from *Rhodococcus erythropolis* HX-2 // *Geomicrobiology Journal*. 2020. Vol. 37. № 2. P. 159–169. doi: 10.1080/01490451.2019.1678702
18. Pagnout C., Jomini S., Dadhwal M. et al. Role of Electrostatic Interactions in the Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles toward *Escherichia coli* // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012. Vol. 92. P. 315–321. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.12.012
19. Sun X.-K., Gong Y., Shang D.-D. et al. Degradation of Alginate by a Newly Isolated Marine Bacterium *Agarivorans* sp. B2Z047 // *Marine Drugs*. 2022. Vol. 20. № 4. 254. doi: 10.3390/md20040254
20. Xu F., Cha Q.-Q., Zhang Y.-Z. et al. Degradation and Utilization of Alginate by Marine Pseudoalteromonas: A Review // *Applied and Environmental Microbiology*. 2021. Vol. 87. № 14. e00368-21. doi: 10.1128/AEM.00368-21
21. Confederat L.G., Tuchilus C.G., Dragan M. et al. Preparation and Antimicrobial Activity of Chitosan and Its Derivatives: A Concise Review // *Molecules*. 2021. Vol. 26. № 12. 3694. doi: 10.3390/molecules26123694