

УДК 574.64, 678.7

Биолюминесцентный анализ токсичности сорбентов на основе полиэтиленimina© 2020 А.А. ОРЛОВА¹, Л.Э. АЛЕСКЕРОВА¹, С.Г. ВАСИЛЬЕВА¹, А.С. МОРОЗОВ¹, А.Д. ИСМАИЛОВ¹, Е.С. ЛОБАКОВА^{1,*}¹Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

*e-mail: elena.lobakova@gmail.com

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 11.05.2020 г.

В работе оценена токсичность и исследовано воздействие сорбентов на основе полиэтиленimina (ПЭИ) и их экстрактов на биолюминесценцию фотобактерий *Photobacterium phosphoreum*, используемых в качестве тест-объектов на токсичность в технологии биотестирования различных материалов. Исследуемые материалы синтезировали путём сшивания ПЭИ с диглицидиловым эфиром диэтиленгликоля (ДЭГ) массовая доля которого варьировалась от 0,9 до 120,0%, с последующим замораживанием. Выявлено, что степень ингибирования люминесценции в клетках *P. phosphoreum* зависит от соотношения ПЭИ/ДЭГ в сорбенте. При стандартной методике биотестирования сорбенты с содержанием ДЭГ от 60–120% не оказывали эффекта тушения биолюминесценции фотобактерий, а при более низком содержании сшивок ДЭГ (0,9–30%) проявляли выраженное ингибиторное действие. Установлено, что эффект ингибирования биолюминесценции фотобактерий сорбентами с низким процентом ДЭГ (<30%) значительно менее выражен в фосфатном буфере, чем в растворах солей. Водные и спиртовые экстракты сорбентов с содержанием ДЭГ более 15% не оказывали существенного влияния на люминесценцию клеток *P. phosphoreum* в течение 1 ч инкубации. Методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показана иммобилизация клеток *P. phosphoreum* на поверхности и внутренних частях исследуемых сорбентов.

Ключевые слова: биолюминесценция, биотест, анализ токсичности, фотобактерии, полимерные сорбенты, полиэтиленimin.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-73-81

В практических задачах охраны окружающей среды широкое применение нашли полимерные и композиционные материалы на основе полиаминов, обладающие высоким сродством к клеткам как прокариотических, так и эукариотических организмов [1, 2]. К указанным полимерам относятся производные полигексаметиленбигуанида, полиэтиленimina, поливинилпиридина, полидиалкиламиноэтил-метилакрилата [3].

Материалы, полученные на основе сшитого полиэтиленimina, в настоящее время широко применяются в различных областях в качестве: ка-

тализаторов [4], ионообменных смол [5], антимикробных агентов [6, 7], подложек для прививания ферментов [8] и тканевой инженерии [9], материалов для селективного извлечения белков [10] и изготовления мембран [11]. Сорбенты с иммобилизованным полиэтиленимином находят применение в биоремедиации, в частности, для извлечения тяжелых металлов [12, 13] и поглощения диоксида углерода [14]. Полимеры на основе сшитых ПЭИ, в том числе сорбенты, у которых в качестве кросс-линкера использовался ДЭГ, обладают высокой эффективностью при иммобилизации

Список сокращений: ПЭИ – полиэтиленimin, ДЭГ – диглицидиловый эфир диэтиленгликоля, СЭМ – сканирующая электронная микроскопия.

микроводорослей, что позволяет использовать их для длительного культивирования в фотобиореакторах и сборе биомассы [15]. Кроме того, предполагается использование сорбентов на основе ПЭИ для сбора в открытых и закрытых водоемах биомассы цианобактерий при их массовом развитии и последующей утилизации [16]. Практическое применение сорбентов *in situ* предполагает оценку их токсичности, стабильности при длительных процедурах использования в водных средах, и возможного влияния продуктов деградации материала на биоту.

В качестве одного из широко применяемых методов анализа токсичности различных материалов используется биотест на основе светящихся бактерий [17, 18]. Показана высокая эффективность применения фотобактерий для определения токсичности отдельных химических соединений, промышленных изделий, контактирующих с пищевыми продуктами, полимерных, композитных и наноматериалов, применяемых в промышленных задачах [19–23]. На практике для анализа токсичности различных химических веществ в качестве тест-объектов применяются *P. phosphoreum* – Microtox-реагенты и аппаратное обеспечение фирмы Векшман (США); другие природные и рекомбинантные штаммы с клонированными генами люминесцентной системы. Биотесты с использованием фотобактерий по своей чувствительности, точности, быстродействию и простоте обычно превосходят существующие аналоги, позволяя в режиме реального времени проводить токсикологический анализ значительного количества проб [17, 18, 19, 24].

Биотест на фотобактериях *Vibrio harvey* ранее успешно реализован в анализе токсичности полимерных сорбентов в виде сферических гранул из сополимера стирола и дивинилбензола с привитым на поверхность разветвленным полиэтиленмином, и волокон, сшитых эпихлоргидрином (30%) в условиях термополимеризации полиаминов [26]. Выявлено различное влияние материалов на эмиссию фотобактерий (активирующее и ингибирующее) [26]. Полученные результаты свидетельствовали о принципиальной возможности заселения сорбентов грамотрицательными бактериями и необходимости предварительной отмывки полимеров от токсичных компонентов перед их применением в открытых водоемах [26].

Технологии биотестирования на фотобактериях разнообразны, однако все они базируются на анализе изменений в эмиссионной активности клетки при воздействии того или иного токсичного агента. Стандартная процедура биодетекции

включает в себя подготовку биолюминесцентного реагента, инкубацию образца с фотобактериями в течение необходимого времени, и определение уровня тушения свечения по остаточной активности по отношению к контролю [19, 25].

Во многих случаях технологии биотестирования включают в себя вспомогательные операции, целью которых является экстракция и концентрирование экстрагируемых веществ. Как правило, эти задачи возникают при анализе токсичности твердых или газообразных субстанций. Поскольку токсичные вещества могут быть как гидрофобными, так и гидрофильными, в качестве экстрагирующих агентов используют как водные, так и органические растворители.

В настоящей работе проведено изучение действия сорбентов на основе полиэтиленминов, сшитых ДЭГ в условиях криополимеризации и их спиртовых экстрактов на интенсивность и кинетику люминесценции фотобактерий. Особое внимание уделено стабильности фотобактерий в сорбентах в ходе инкубации в солевых растворах, и влиянию концентрации сшивающего агента на структурные параметры материалов. При анализе токсичности сорбентов нельзя было исключить возможность адгезии бактерий на материал сорбента, что с одной стороны могло изменить адсорбционные свойства материалов в случае практического использования, с другой стороны адсорбированные фотобактерии могли быть более чувствительны к ингибиторному действию материалов носителя. Поэтому наряду с исследованием токсичности изучена возможность заселения сорбентов клетками фотобактерий.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Синтез и характеристика ПЭИ

40 мл 50% водного раствора высоковетвленного (ПЭИ) (Mw 50-100 kDa,) (MP Biomedicals, Santa Ana, США) растворяли в 33 мл этилового спирта, к полученному раствору прибавляли ДЭГ (для К-ДЭГ120 – 3,2 мл ДЭГ, для К-ДЭГ60 1,6 мл, К-ДЭГ30 – 0,81мл и т.д) («Контакт», Держинск, Россия) помещали в 50-мл пластиковую колбу с винтовой крышкой. Смесь перемешивали с помощью шейкера в течение 2 мин и хранили в течение ночи в морозильной камере при –18 °С. После размораживания полимер фильтровали на воронке Бюхнера и промывали несколько раз этанолом, затем помещали в круглодонную колбу объемом 100 мл с 40 мл этанола. Смесь кипятили в течение 2–3 ч для устранения избытка ДЭГ. После охлаждения до комнатной температуры полимер фильтровали на воронке Бюхнера,

промывали этанолом и дистиллированной водой до pH 8–9, затем лиофилизировали. Основные характеристики сорбентов представлены в Табл. 1.

Таблица 1

Характеристики сорбентов на основе ПЭИ
PEI-polymers characteristics

Название сорбента	Содержание сшивающего агента, (масс. %)	Удельная поверхность, м ² /г
К-ДЭГ0,9	0,9	< 20
К-ДЭГ3,8	3,8	< 20
К-ДЭГ7,5	7,5	< 20
К-ДЭГ15	15,0	< 20
К-ДЭГ30	30,0	21,0
К-ДЭГ60	60,0	38,0
К-ДЭГ120	120,0	36,0

Характеристика поверхности сорбентов

Удельную поверхность определяли с помощью адсорбции азота в приближении BET (Brunauer-Emmett-Teller) на приборе Beckman Coulter SA 3100 (Coulter Corporation, США). Для анализа отбирали навески сорбентов весом примерно 0,1 г, которые предварительно сушили при 120 °С в вакууме в течение 1 ч. Данные представлены в Табл. 1.

Анализ набухания сорбентов

Навески сорбентов (15–50 мг) помещали в стеклянную емкость объемом 4 мл и прибавляли 3,0 мл 0,01М фосфатного буферного раствора (pH 9,0). Инкубирование проводили при комнатной температуре в течение 1 ч. Набухание рассчитывали по формуле 1. Данные представлены на рисунке 1, как среднее из пяти измерений.

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

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

Биолюминесцентный анализ проб

Воздействие сорбентов на биолюминесценцию фотобактерий *P. phosphoreum* ККМ МГУ 331, выделенных из *Myoxocephalus Scorpius* – придонной рыбы Кандалакшского залива Белого моря [28] изучали в соответствии со стандартными методиками определения токсичности исследуемых образцов [19, 30]. 100 мкл суспензии фотобактерий ($3 \cdot 10^7$ клеток/мл) в 2 мл 2% NaCl или в 2 мл 0,1М фосфатного буферного солевого раствора (PBS) (pH 7,5) инкубировали с 50 мг лиофилизованного ПЭИ.

Интенсивность биолюминесценции регистрировали с помощью люминометра (1250 LKB-Wallac, США) через 5, 15, 30 и 60 мин инкубации. В качестве контроля использовали пробу без сорбента. Ингибиторный эффект оценивали по величине остаточной биолюминесценции опытной пробы по отношению к контрольной

$$\frac{I_o - I_k}{I_k} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где I_o – интенсивность биолюминесценции пробы, I_k – интенсивность люминесценции контроля.

Биолюминесцентный анализ экстрактов сорбентов

Сорбенты (200 мг) инкубировали в 1,5 мл воды или в 96% этаноле в течение 24 ч. Конечные концентрации этанольного экстракта сорбентов в пробе при измерении люминесценции фотобактерий составляли: $6 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-3}$, $6 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-2}$, $6 \cdot 10^{-2}$, $3 \cdot 10^{-1}$, $6 \cdot 10^{-1}$, 3,33%. В качестве контроля использовали пробу с этанолом в соответствующей концентрации. Пробы анализировали после инкубации в течение 15, 30, 60 мин. Все эксперименты проводили в трех повторях и определяли среднее значение.

Ингибиторный эффект оценивали по величине остаточной биолюминесценции опытной пробы по отношению к контрольной.

Адгезия фотобактерий на сорбентах

Для изучения возможности заселения сорбентов фотобактериями инкубировали 50 мг каждого сорбента с суспензией фотобактерий ($5 \cdot 10^9$ кл/мл)

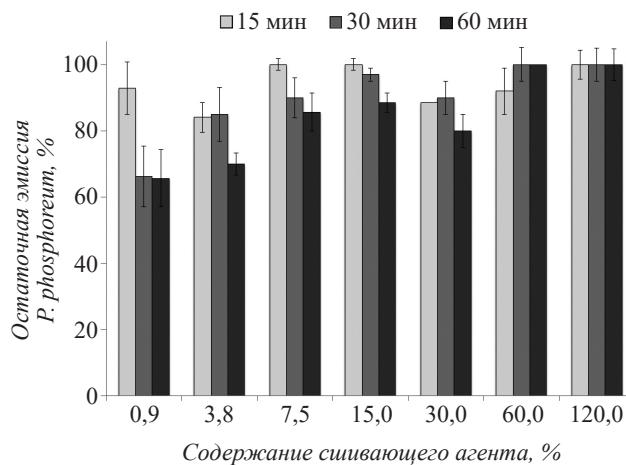


Рис. 1. Остаточная эмиссия *P. phosphoreum* после инкубации с сорбентами в течение 15, 30 и 60 мин в 2,2% NaCl.

Fig. 1. The residual emission of *P. phosphoreum* after incubation with sorbents during 15, 30 and 60 minutes in 2.2% NaCl.

в 2 мл среды для глубинного культивирования в течение 22 ч при 22 °С без аэрации и перемешивания. Образцы сорбентов после инкубации четырежды промывали 10 мл 2,2% NaCl, затем вносили в 2 мл 2,2% NaCl и анализировали интенсивность люминесценции. Все эксперименты проводили в трех повторах.

Сканирующая электронная микроскопия

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) сорбенты на основе ПЭИ без клеток подвергали сублимационной сушке.

Образцы сорбентов с адсорбированными на них клетками фиксировали 12% раствором глутарового альдегида в 0,1М какодилатном буфере pH 7,2 в течение 1 ч, затем обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и помещали на ночь в 100% ацетон. Образцы высушивали при критической точке на установке «DryerHCP-2» (Hitachi, Япония), напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке «IB-3 Ion-Coater» (Eiko, Япония) и исследовали с помощью сканирующего микроскопа JSM-6380LA (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 15Кв и инструментальном увеличении 60–20000.

Статистика

Все эксперименты проводили в трёх повторах. Ошибка экспериментов не превышала 10%. Статистическую обработку полученных данных проводили в программе MS Excell 2013.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биолюминесцентный анализ токсичности сорбентов на основе ПЭИ

Анализ изменения интенсивности биолюминесценции исследуемого штамма *P. phosphoreum* при инкубации с сорбентами на основе ПЭИ в течение одного ч показал, что сорбенты с наименьшим содержанием сшивающего агента К-ДЭГ0,9, К-ДЭГ3,8, и К-ДЭГ7,5 постепенно снижают биолюминесценцию в течение ч до 30–34% (рис. 1). Сорбенты с высокой концентрацией сшивающего агента – К-ДЭГ60 и К-ДЭГ120 не оказывают отрицательного влияния на биолюминесценцию, в то время как сорбенты К-ДЭГ15 и К-ДЭГ30 в течение 1 ч инкубации. вызывают незначительное ингибирование (на 11–20%).

При более длительной инкубации в 2,2% растворе NaCl ингибиторное действие сорбентов существенно возрастает (рис. 2). Инкубация *P. phosphoreum* с сорбентами К-ДЭГ0,9, К-ДЭГ3,8, К-ДЭГ7,5 в течение 22 ч привела к полному ингибированию биолюминесценции по сравнению с контролем. В то же время в пробах с сорбентами

К-ДЭГ60, К-ДЭГ120 наблюдали незначительное ингибирование биолюминесценции (рис. 2) Примечательно, что степень ингибирования биолюминесценции в клетках *P. phosphoreum* зависела от соотношения ПЭИ/ДЭГ в структуре сорбента. Сорбенты с более низким содержанием сшивающего агента (ДЭГ) оказывали сильное ингибирующее действие на биолюминесценцию в течение 22 ч инкубирования (рис. 2).

Согласно опубликованным данным [6], сорбенты на основе ПЭИ являются поликатионными благодаря наличию аминогрупп, которые активно взаимодействуют с отрицательно заряженными поверхностными структурами бактерий. Таким образом, чем ниже процент сшивки в сорбентах, тем выше количество сайтов связывания для бактериальных клеток. Сообщалось, что аминогруппы цепей ПЭИ взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов [6] и способны проникать в структуры клеточной стенки бактерий, не попадая в анионные слои пептидогликана и липосахаридов. Это приводит к разрушению клеточных стенок [29]. Мы предположили, что слабо сшитые сорбенты К-ДЭГ0,9, К-ДЭГ3,8, К-ДЭГ7,5 характеризуются наличием подвижных цепей ПЭИ, которые могут проникать в структуры клеточной стенки фотобактерий, вызывать ингибирование их метаболической активности и последующее разрушение

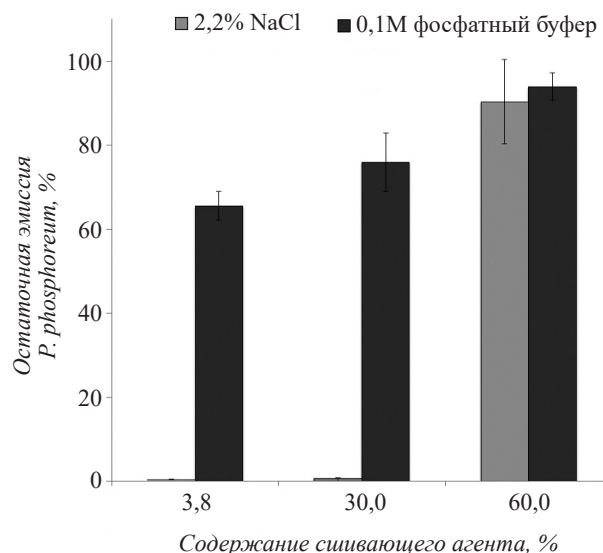


Рис. 2. Остаточная эмиссия *P. phosphoreum* после инкубации с сорбентами К-ДЭГ3,8, К-ДЭГ30, К-ДЭГ60 в течение 22 ч в 2,2% NaCl и 0,1М фосфатном буфере pH 7,5.

Fig. 2. The residual emission of *P. phosphoreum* after incubation with sorbents P-G3.8, P-G30, P-G60 during 22 hours in 2.2% NaCl and 0.1M phosphate buffer pH 7.5.

клеток. Напротив, сорбенты К-ДЭГ120, К-ДЭГ60 характеризуются высокой степенью сшивания между цепями ПЭИ, что ограничивает движение полимерных цепей, предотвращая разрушение бактериальных стенок.

Оценку токсичности сорбентов проводили при инкубации клеток *P. phosphoreum* в фосфатном буфере с pH 7,5 (рис. 2). В этих условиях ингибирующее действие сорбентов с более низким процентом сшивки ДЭГ (<30%) значительно менее выражено, чем в растворах солей. Объяснение этих эффектов связано с уменьшением катионного заряда ПЭИ за счет быстрого взаимодействия аминогрупп на поверхности с фосфатными группами буфера. При этом количество доступных сайтов связывания для прикрепления бактерий значительно уменьшается, что приводит к снижению ингибирующего действия сорбентов на биолюминесцентную активность фотобактерий.

Биолюминесцентный анализ токсичности экстрактов сорбентов на основе ПЭИ

Для определения наличия токсичных веществ, выделяемых сорбентами в среду, исследовано влияние их водных и спиртовых экстрактов на люминесценцию фотобактерий. Выявлено, что водные экстракты всех исследуемых сорбентов не оказывали ингибирования биолюминесценции после 1 ч инкубации.

Спиртовые экстракты сорбентов К-ДЭГ0,9, К-ДЭГ3,8, К-ДЭГ7,5 ингибировали люминесценцию *P. phosphoreum* на 20% (рис. 3) через 1 ч инкубации. Наибольшая концентрация этанола в пробах составила 3,3%, а контрольные опыты с использованием растворителя при тех же концентрациях не выявили уменьшения биолюминесцентной активности. Таким образом, испытанные сорбенты не содержали в своих водных и

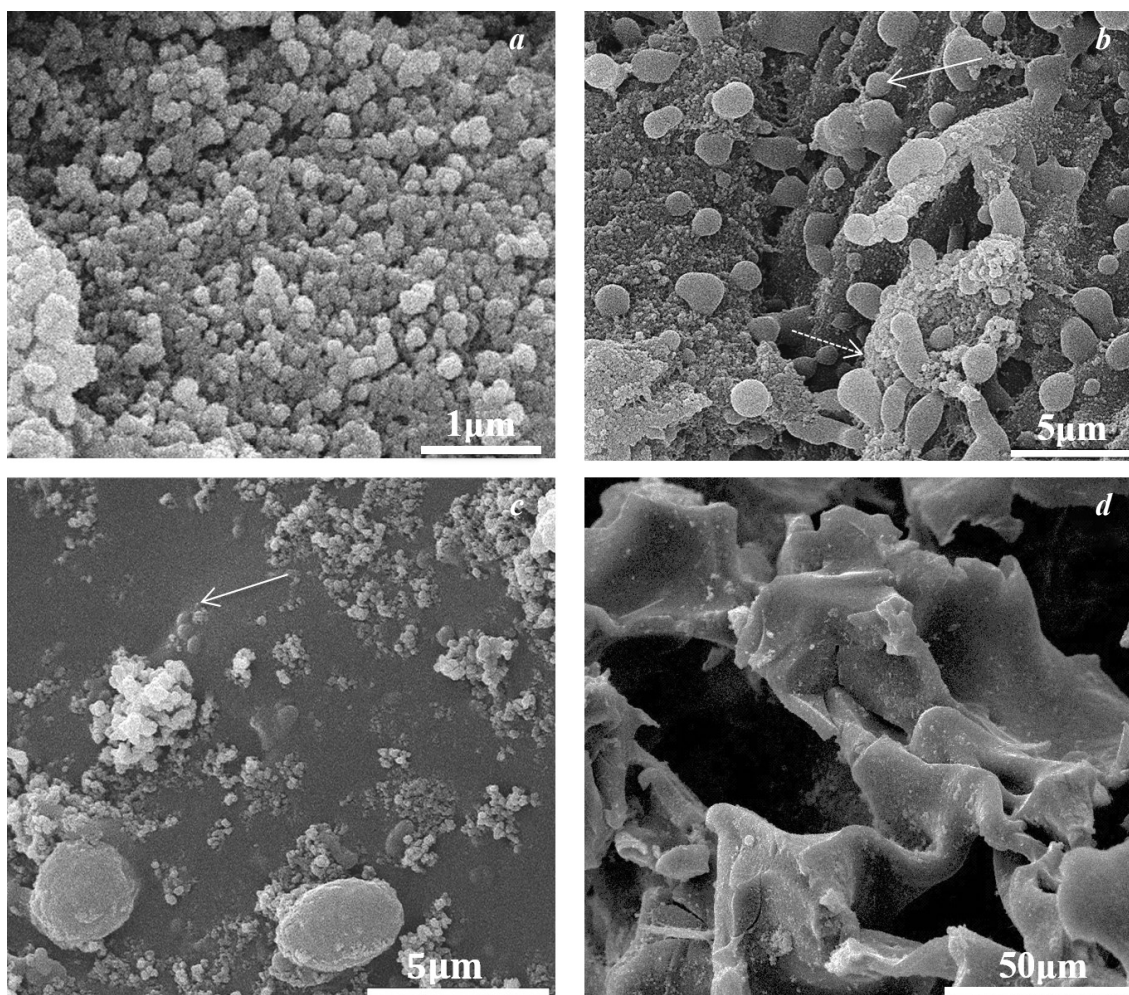


Рис. 3. СЭМ-фотографии поверхности К-ДЭГ0,9 (a), К-ДЭГ3,8 (b), К-ДЭГ60 (c) и К-ДЭГ7,5 (d). Сферические и бочкообразные выросты обозначены постоянными и пунктирными стрелками соответственно (b). Стрелка (c) указывает на трещины на полимерной поверхности.

Fig. 3. SEM micrographs of the surface P-G0.9 (a, b), P-G60 (c) and P-G7.5 (d). The spherical and barrel-shaped outgrowths are indicated by constant and dashed arrows correspondently (b). The arrow (c) indicates cracks on the polymeric surface.

этанольных экстрактах критических концентраций токсичных веществ. Совокупность результатов, полученных по прямому действию сорбентов и их экстрактов не позволяют разграничить ингибиторное действие сорбентов и выделяемых ими в водную среду веществ.

Характеристики поверхности и структуры сорбентов на основе ПЭИ

Структура сорбентов существенно зависит от концентрации сшивающего агента. Сшивание ПЭИ с 15–120% ДЭГ приводило к образованию твердых полимерных гранул различных размеров, которые отличались поверхностной структурой и уровнем пористости. Если количество ДЭГ было ниже 7,5%, то полимеры представляли собой аморфную пористую массу. Методом СЭМ выявлено, что на поверхности сорбента К-ДЭГ0,9 присутствуют многочисленные сферические, полусферические, папиллярные и бочкообразные выросты (рис. 3а). Размер сферических элементов на поверхности составляет от 1 мкм до 2,5 мкм, а бочкообразных – от 1 мкм до 3,5 мкм. Поверхность сорбента К-ДЭГ3,8 также характеризуется наличием сферических и полусферических выростов, но бочкообразных структур не обнаружено (рис. 3б). Поверхность сорбента К-ДЭГ7,5 (рис. 3д) выражена складчатой формой с выступающими кавернами (10–20 мкм в диаметре), образованными небольшими сферами диаметром до 0,5 мкм.

Структура сорбентов К-ДЭГ30, К-ДЭГ120 и К-ДЭГ60 пористая, диаметры канавок и пор различного размера (шириной 15–80 мкм) (рис. 3с). Поверхность этих сорбентов образовалась в процессе криополимеризации, которая происходила вокруг кристаллов льда.

Следует отметить, что сорбенты К-ДЭГ0,9, К-ДЭГ3,8, К-ДЭГ7,5, К-ДЭГ15 и К-ДЭГ30 характеризуются примерно одинаковой удельной поверхностью, которая была почти в два раза ниже, чем у К-ДЭГ60 и К-ДЭГ120. Более высокая площадь поверхности сорбентов с 60–120% содержанием ДЭГ может быть объяснена наличием многочисленных канавок и пор.

Набухание является важным свойством полимеров, предназначенных для применения в водных средах. Выявлено, что все исследуемые сорбенты набухают в воде, что, вероятно, повышает доступность внутренних объемов полимеров для иммобилизации бактерий и адсорбции различных веществ. Проведенные исследования показали, что при инкубации в солевом растворе (2,2% NaCl) степень набухания большинства полимеров повышалась со снижением процента сшивающего агента (рис. 4). Однако сорбенты К-ДЭГ3,8 и К-ДЭГ0,9 при инкубации необратимо

меняют состояние на гелеобразное, что делает невозможным измерение степени их набухания.

Наблюдаемое увеличение степени набухания может быть объяснено более высокой подвижностью слабо сшитых цепей ПЭИ, увеличением свободного объема внутри сорбента для поступления воды. Степень набухания у сильно сшитых сорбентов (К-ДЭГ60 и К-ДЭГ120), характеризующихся ограниченным доступом молекул воды в свободный объем полимерных цепей, неизменна.

Было обнаружено, что в течение 22 ч инкубации некоторых сорбентов в 2,2% NaCl происходит сдвиг pH среды в щелочную сторону. Наибольшие изменения (от 6,5 до 8–8,5) были обнаружены у проб с сорбентами с низким процентом ДЭГ (<15%) (рис. 5). Инкубация сорбентов К-ДЭГ30, К-ДЭГ60 и К-ДЭГ120 не вызывала изменений pH среды. Оптимальные значения для люминесценции фотобактерий находятся в диапазоне pH 6,5–7,5, поэтому сдвиг pH в щелочную сторону является важным эффектом подавления свечения. Мы предположили, что ингибирование люминесценции фотобактерий, инкубированных с сорбентами К-ДЭГ0,9, К-ДЭГ3,8, К-ДЭГ7,5, К-ДЭГ15, частично объясняется изменением pH среды в щелочную сторону и не связано с токсичностью сорбентов. Как упоминалось выше (рис. 2) ингибирующее действие сорбентов в фосфатном буфере pH 7,5 было менее выражено, чем в солевом растворе. В течение 22 ч инкубации К-ДЭГ3,8 в фосфатном буфере ингибирование люминесценции *P. phosphoreum* составляло только 33% по сравнению с контролем, в то время как инкубация в растворе NaCl сопровождалась полным ингибированием эмиссионной активности.

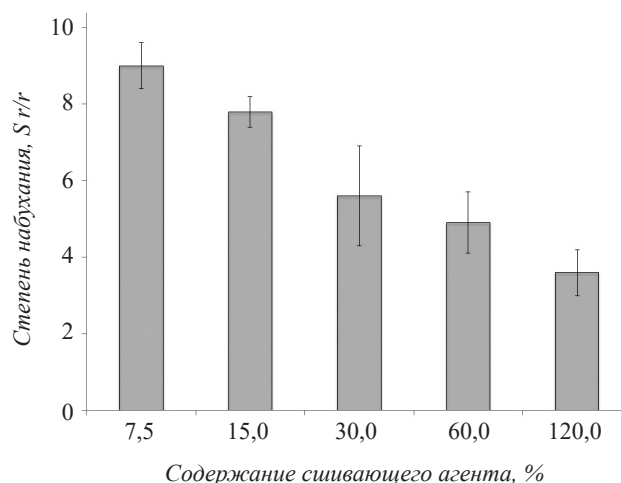


Рис. 4. Набухание сорбентов с различной концентрацией сшивающего агента.

Fig. 4. Swelling of sorbents with different concentration of a cross-linking agent.

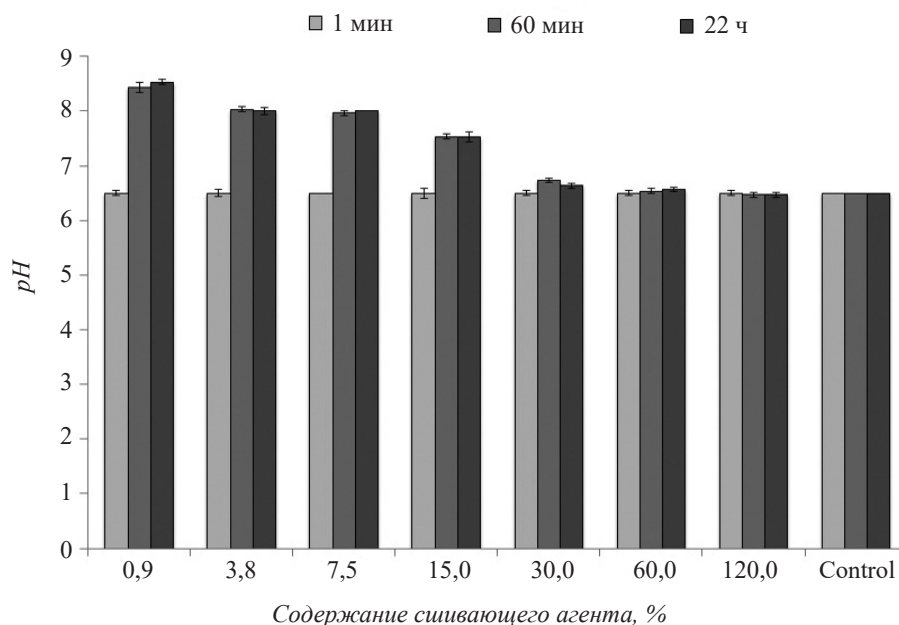


Рис. 5. Изменение pH среды через 1, 60 мин и 22 ч инкубации *P. phosphoreum* с сорбентами на основе ПЭИ в 2,2% NaCl.

Fig. 5. pH changes after 1, 60 min and 22 hours of *P. phosphoreum* and PEI-sorbents incubation in 2.2 % NaCl.

Биоломинесцентный анализ адгезии фотобактерий на сорбентах

Изучение адгезии *P. phosphoreum* на носители проводили в ходе инкубации с фотобактериями в течение 22 ч в среде для глубинного культивирования. Перед проведением биоломинесцентного анализа сорбенты тщательно промывали, чтобы удалить незакрепленные клетки. Высокий уровень интенсивности биоломинесценции по сравнению с контролем наблюдали для сорбентов К-ДЭГ60, К-ДЭГ120 (рис. 2). При этом, для сорбентов с более низким процентом сшивки (<30%) эмиссионной активности не детектировали. Как и предполагалось, биосовместимость исследуемых сорбентов зависела от их химического состава, так как снижение процента ДЭГ в составе материала может привести к усилению взаимодействия с клетками и разрушению клеточных стенок бактерий. Предположение о возможном ингибиторном эффекте на свечение за счет адсорбции бактерий за время анализа токсичности (1 ч) не подтвердилось. Тушение свечения за счет адсорбции бактерий наблюдалось только при более длительном инкубационном периоде – 22 ч. Жизнеспособность фотобактерий, иммобилизованных на сорбентах с высоким соотношением ПЭИ/ДЭГ, также может снижаться за счет сдвига pH среды в щелочную сторону, неоптимальную для проявления люминесценции клетками *P. phosphoreum*.

Полимерные материалы на основе сшитого высокоразветвленного ПЭИ предполагается использо-

вать для предотвращения массового развития оксигенных фототрофных микроорганизмов в открытых водоемах, очистки сточных вод [31] и иммобилизации микроводорослей при промышленном культивировании [15]. В данной работе изучено взаимодействие сорбентов с грамотрицательными морскими светящимися бактериями *P. phosphoreum*. Широко известно использование этих бактерий в качестве биосенсоров для анализа токсичности различных материалов и субстанций. В данной работе дана первичная оценка взаимодействия сорбентов, на основе сшитых ПЭИ и морских бактерий. Полученные данные позволяют сравнить токсичность полимерных материалов, синтезированных путём сшивания ПЭИ с различным процентным содержанием ДЭГ при замораживании. Судя по результатам, сорбенты и их экстракты не оказывали существенного влияния на люминесценцию *P. phosphoreum* в течение 1 ч инкубации. После 22 ч инкубации сорбенты с более низким содержанием ДЭГ (1,8–30,0%) оказывали сильное ингибирующее действие на биоломинесценцию. Напротив, полимеры К-ДЭГ120, К-ДЭГ60 с высоким содержанием кросс-линкера не влияли на люминесцентную активность бактерий. Исследование сорбентов методом СЭМ после инкубации с фотобактериями в течение 22 ч подтвердило результаты биоломинесцентных тестов (рис. 6). Показано, что клетки *P. phosphoreum* активно заселили и делились, формируя микроколонии на поверхности сорбентов с 60–120% ДЭГ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сорбенты с высокой степенью

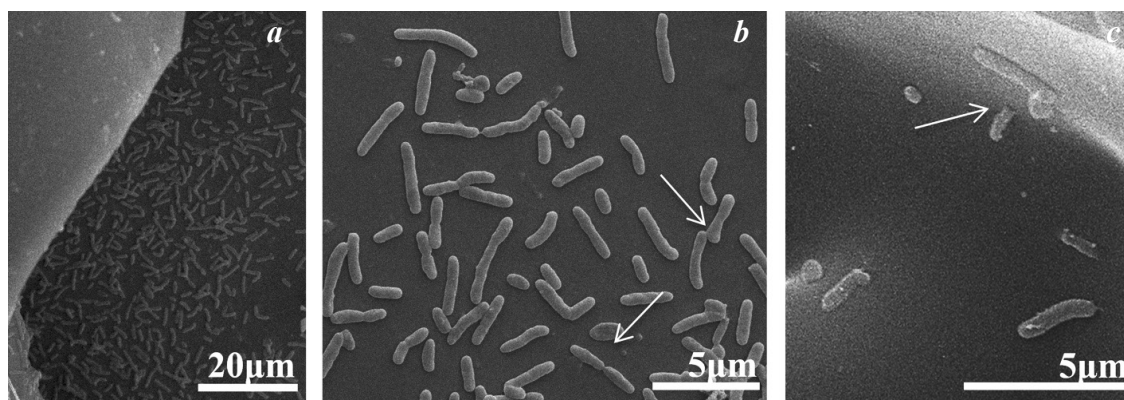


Рис. 6. СЭМ-микрофотографии клеток *P. phosphoreum*, прикреплённых к поверхности К-ДЭГ120. Стрелка (b) указывает на клетку *P. phosphoreum* в процессе деления, стрелка (c) указывает на клетку, интегрированную в поверхность сорбента.

Fig. 6. SEM micrographs of *P. phosphoreum* cells attached to the surface of P-G120. The arrow (b) indicates the cell in the fission state, the arrow (c) indicates the cell integrated into the polymeric surface.

сшивки К-ДЭГ120, К-ДЭГ60 биосовместимы с фотобактериями *P. phosphoreum* и не оказывают токсического эффекта на биолюминесценцию.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-00112).

ЛИТЕРАТУРА

- Kenawy ER, Worley SD, Broughton R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules* 2007, 8(5), 1359–1384. <https://doi.org/10.1021/bm061150q>
- Nigmatullin R, Gao F. Onium-functionalised polymers in the design of non-leaching antimicrobial surfaces. *Macromol Mater and Engineering* 2012, 297(11). <https://doi.org/10.1002/mame.201200142>
- Muñoz-Bonilla A, Fernández-García M. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog Polym Sci* 2012, 37(2), 281–339. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005>
- Bromberg L, Fasoli E, Alvarez M, Hatton TA, Barletta GL. Biguanide-, imine-, and guanidine-based networks as catalysts for transesterification of vegetable oil. *React Funct Polym* 2010, 70(7), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2010.04.003>
- Chen DP, Yu C, Chang CY, Wan Y, Frechet JMJ, Goddard WA, Diallo MS. Branched polymeric media: Perchlorate-selective resins from hyperbranched polyethyleneimine. *Environ Sci Technol* 2012, 46, 10718–10726. <https://doi.org/10.1021/es301418j>
- Nuzhdina AV, Morozov AS, Kopitsyna MN, Strukova EN, Shlykova DS, Bessonov IV, Lobakova ES. Simple and versatile method for creation of non-leaching antimicrobial surfaces based on cross-linked alkylated polyethyleneimine derivatives. *Mater Sci Eng C* 2017, 70(1), 788–795. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.033>
- Yudovin-Farber I, Golenser J, Beyth N, Weiss EI, Domb AJ. Quaternary Ammonium Polyethyleneimine: Antibacterial Activity. *J. Nanomater* (2010), 2, 11. <https://doi.org/826343>
- Zemek J, Kuniak L, Gemeiner P, Zámocký J, Kučár Š. Crosslinked polyethyleneimine: An enzyme carrier with spacers of various lengths introduced in crosslinking reaction. *Enzyme Microb Technol* 1982, 4(4), 233–238. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(82\)90037-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(82)90037-0)
- Khanam N, Mikoryak C, Draper RK, Balkus KJ. Electrospun linear polyethyleneimine scaffolds for cell growth. *Acta Biomater* 2007, 3(6), 1050–1059. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.06.005>
- Wang F, Liu P, Nie T, Wei H, Cui Z. Characterization of a polyamine microsphere and its adsorption for protein. *Int J Mol Sci* 2013, 14(1), 17–29. <https://doi.org/10.3390/ijms14010017>
- Giffin GA, Castillo FY, Frech R, Glatzhofe DT, Burbac CM. Spectroscopic investigation of proton-conducting, cross-linked linear poly(ethyleneimine) hydrochloride membranes. *Polymer (Guildf)* 2009, 50(1), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.10.051>
- Leusch A, Holan ZR, Volesky B. Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by chemically-reinforced biomass of marine algae. *J. Chem Technol Biotechnol* 1995, 62(3), 279–288. <https://doi.org/10.1002/jctb.280620311>
- Saad D, Cukrowska E, Tutu H. Development and application of cross-linked polyethyleneimine for trace metal and metalloid removal from mining and industrial wastewaters. *Toxicol Environ Chem* 2011, 93, 914–924.
- Li P, Ge B, Zhang S, Chen S, Zhang Q, Zhao Y. CO₂ capture by polyethyleneimine-modified fibrous adsorbent. *Langmuir* 2008, 24(13), 6567–6574. <https://doi.org/10.1021/la800791s>
- Vasilieva S, Shibzukhova K, Morozov A, Solovchenko A, Bessonov I, Lobakova E, et al. Immobilization of microalgae on the surface of new cross-linked polyethyleneimine-based sorbents. *J. Biotechnol In Press* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.03.011>
- Bessonov I., Morozov A, Lobakova E, et al. Macroporous sorbents for removing cyanobacteria from the water environment/ Pat. 2620388 Russian Federation. № 2015151201; statement 30.11.15; published 25.05.17, bulletin № 15, 1 p.
- Bulich AA, Isenberg DL. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. *ISA Trans* 1981, 20 (1), 29–33.
- Ismailov AD, Aleskerova LE. Photobiosensors containing luminescent bacteria. *Biochem (Moscow)* 2015, 80(6), 733–744. <https://doi.org/10.1134/S0006297915060085>

19. Bulich AA. Use of Luminescent Bacteria for Determining Toxicity in Aquatic Environments, in: *Aquatic Toxicology. Proceedings of the Second Annual Symposium on Aquatic Toxicology 1979*, p-p 98–98. <https://doi.org/10.1520/STP34880S>
20. Isenberg D, Bulich A. Environmental Monitoring: Use of Luminescent Bacteria. In: Richardson M. (ed), *Chemical Safety: International Reference Manual 1994*, 211–226.
21. Jin HL, Mitchell RJ, Byoung CK, Cullen DC, Man BG. A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. *Biosens Bioelectron* 2005, 21(3), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.12.015>
22. Durand MJ, Hua A, Jouanneau S, Cregut M, Thouand G. Detection of metal and organometallic compounds with bioluminescent bacterial bioassays. In: G. Thouand, R. Marks. (Eds.), *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology*. 3. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2016, 77–99. https://doi.org/10.1007/10_2015_33
23. hilp JC, Balmand S, Hajto E, Bailey MJ, Wiles S, Whiteley AS, Lilley AK, Hajto J, Dunbar SA. Whole cell immobilised biosensors for toxicity assessment of a wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste. *Anal Chim Acta* 2003, 487(1), 61–74. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00358-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00358-1)
24. Jouanneau S, Durand MJ, Lahmar A, Thouand G. Main technological advancements in bacterial bioluminescent biosensors over the last two decades. In: G. Thouand, R. Marks. (Eds.), *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology*. 3. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2016, 101–116. https://doi.org/10.1007/10_2015_332
25. Ismailov AD, Sobolev AJ, Danilov VS. Bioluminescence decay kinetics in the reaction of bacterial luciferase with different aldehydes. *J. Biolumin Chemilumin* 1990, 5, 213–217.
26. Lobakova ES, Aleskerova LE, Orlova AA, Vasilieva SG, Ismailov AD. Effect of polyethylenimine-based sorbents on the luminescence of photobacteria. *Microbiology* 2017, 86, 138–140. <https://doi.org/10.1134/S002626171701009X>
27. Artyukhov AA, Shtilman MI, Kuskov AN, Fomina AP, Lisovy DE, Golunova AS, Tsatsakis AM Macroporous polymeric hydrogels formed from acrylate modified polyvinyl alcohol macromers. *J. Polym Res* 2011, 18, 667–673.
28. Kuts VV, Ismailov AD. Physiological and emission characteristics of the luminescent bacterium *Photobacterium Phosphoreum* from the White Sea. *Microbiology* 2009, 78, 554–558. <https://doi.org/10.1134/S002626170905004X>
29. Lee B, Lee J, Shin D, Kim E. Statistical optimization of bioluminescence *Photobacterium phosphoreum* KCTC 2852. *Environ Int* 2006, 32(2), 265–268.
30. Gibneya K, Sovadinovab I, Lopezb A, Urbanc M, Ridgway Z, Caputo G, Kuroda K. Poly(ethylene imine)s as antimicrobial agents with selective activity. *Macromol Biosci* 2012, 12(9), 1279–1289. doi: 10.1002/mabi.201200052
31. Lobakova ES, Vasilieva SG, Shibzukhova KA, Morozov AS, Solovchenko AE, Orlova AA, et al. Immobilization of cyanobacteria and microalgae on polyethylenimine-based sorbents. *Microbiology* 2017, 86, 629–639. <https://doi.org/10.1134/S0026261717050137>

Bioluminescence Toxicity Assay of Polyethylenimine-Based Sorbents

A.A. ORLOVA¹, L.E. ALESKEROVA¹, S.G. VASILIEVA¹, A.S. MOROZOV¹, A.D. ISMAILOV¹, and E.S. LOBAKOVA^{1,*}

¹*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

**e-mail: elena.lobakova@gmail.com*

Received November 21, 2019

Revised March 25, 2020

Accepted May 11, 2020

Abstract—The toxicity of polyethylenimine-based sorbents and their extracts was evaluated and their effect on the bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* photobacteria was studied. These test bacteria are commonly used as objects to determine the toxicity of various materials. The analyzed materials were synthesized by cross-linking PEI with diethylene glycol diglycidyl ether (DGDE) at mass contents of the latter of 1.9–120.0% with subsequent freezing. It was found that the degree of luminescence inhibition in the *P. phosphoreum* cells depended on the PEI/DGDE ratio in the sorbent. The sorbents with high DGDE content (60–120%) did not affect the cell luminescence activity, while those with a lower percentage of the cross-linker (0.9–30%) exerted a pronounced inhibitory effect on luminescence of photobacteria according to the data obtained via the standard biotesting method. It was also established that the inhibitory effect of sorbents with a lower DGDE percentage (<30%) in a phosphate buffer was significantly lower than in salt solutions. Water and ethanol extracts of sorbents with the DGDE mass percentage of more than 15% did not significantly inhibit the luminescence of *P. phosphoreum* during 1 h of incubation. Immobilization of *P. phosphoreum* cells on the surface and internal parts of the studied sorbents was observed by the method of scanning electron microscopy.

Key words: bioluminescence, biotest, toxicity analysis, photobacteria, polymer sorbents, polyethylenimine

Funding—This study was funded by the Russian Science Foundation (Grant no. 16-14-00112).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-73-81