

УДК 579.2:579.26:579.6

АДСОРБЦИОННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК РОДОКОККОВ В ГИДРОФОБИЗОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ШИРОКОПОРИСТОГО ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО КРИОГЕЛЯ

© 2011 г. М. С. Куюкина*, И. Б. Ившина*, Е. В. Рубцова*, Р. В. Иванов**, В. И. Лозинский**

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081

e-mail: kuyukina@iegm.ru

**Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Поступила в редакцию 13.06.2010 г.

Исследован процесс адсорбции клеток *Rhodococcus ruber* на колонках с полиакриламидным криогелем (криоПААГ), частично гидрофобизованным с помощью различного количества (0,2, 1 и 5 мол. %) химически привитых остатков *n*-додекана. Определены адсорбционная емкость (1.1×10^9 кл./г) гелевого носителя в отношении клеток родококков и оптимальное содержание (1 мол. %) гидрофобизирующих группировок. Посредством респирометрического метода установлены высокая каталитическая активность и функциональная стабильность иммобилизованных бактериальных клеток. Дыхательная активность иммобилизованных родококков в присутствии модельной смеси углеводов нефти на 12–17% превышала соответствующий показатель для свободных клеток. Жизнеспособность адсорбционно закрепленных в гидрофобизованном криоПААГ клеток родококков сохранялась на уровне 93–95% после полугодичного периода хранения. Полученные результаты могут быть использованы при разработке иммобилизованного биокатализатора для направленной трансформации углеводородных соединений и биологической очистки нефтезагрязненной воды.

В настоящее время актинобактерии рода *Rhodococcus* являются одной из наиболее перспективных для биотехнологического использования групп микроорганизмов благодаря высокой активности оксигеназного ферментного комплекса и, следовательно, способности к окислительной трансформации разнообразных природных и антропогенных органических соединений (углеводороды, фенолы, стероиды и др.) [1–3]. Реализация биотехнологического потенциала родококков требует разработки устойчивых биокатализаторов. Эффективным и экспериментально простым способом повышения стабильности биокатализаторов является использование приема адсорбционной иммобилизации бактериальных клеток. Известно, что иммобилизованные микроорганизмы обладают повышенной клеточной стабильностью, ферментативной активностью и устойчивостью к действию неблагоприятных факторов среды (низкие и повышенные температуры, рН, соленость среды, присутствие токсичных ксенобиотиков) по сравнению со свободными клетками [4]. Помимо биологических свойств иммобилизуемых клеток, большое значение для эксплуатационных показателей соответствующей биокаталитической системы имеют характеристики используемого носителя, который должен отвечать определенным требованиям в отношении стабильности, механической прочности, пористости, устойчивости к механическому износу (в случае работы в реакторе с перемешиванием), доступности и т.д. [5]. Перспективными материалами являются

полимерные криогели, которые широко применяются в биотехнологии в качестве носителей иммобилизованных клеток и ферментов, пористых матриц для приготовления иммунсорбентов и хроматографических насадок, подложек для объемного выращивания животных клеток, а также использования в качестве заменителя агарового геля при культивировании микробных и растительных клеток [6]. Важной особенностью строения криогелей является система связанных между собой макропор, что способствует беспрепятственному транспорту питательных веществ и отводу метаболитов [7]. Широкопористый полиакриламидный криогель (криоПААГ) [8] содержит крупные поры сечением примерно от 25 до 250 мкм (в зависимости от температуры криотропного гелеобразования), обладает хорошей механической прочностью, химической стабильностью, а также допускает возможность химических модификаций для придания матрице носителя желаемого комплекса свойств, например введения реакционноспособных группировок для ковалентного присоединения клеток [9] или гидрофобизации адсорбента с целью повышения сродства к клеткам углеводородокисляющих бактерий [6]. Ранее нами [10] была показана принципиальная возможность использования частично гидрофобизованного криоПААГ для избирательной адсорбции клеток родококков из смешанных бактериальных популяций. При этом иммобилизованные клетки проявляли высокую углеводородокисляющую активность. Поэтому необходимо было выявить наи-

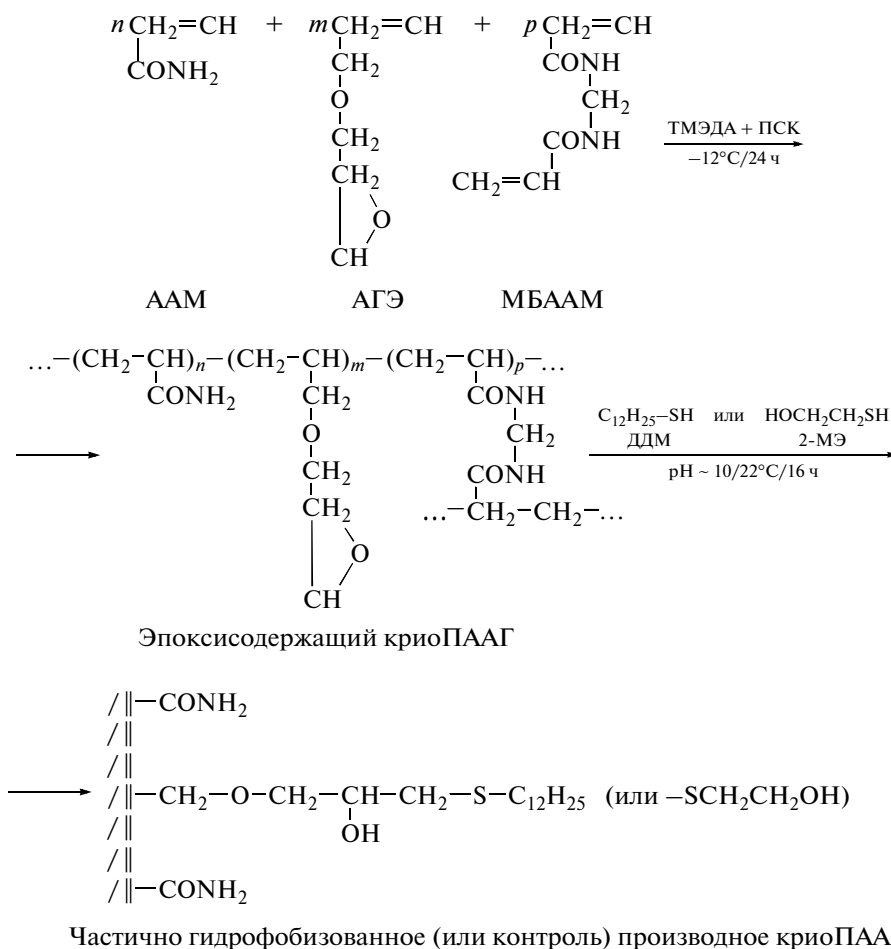


Рис. 1. Схема синтеза частично гидрофобизованных производных криоПААГ и контрольного (гидрофильного) носителя.

более оптимальный вариант системы для иммобилизации таких микроорганизмов.

Цель работы – изучение адсорбции клеток *R. ruber* в колонках с производными криоПААГ, частично гидрофобизованными различным количеством химически привитых остатков n-додекана.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования.

Использовали культуры актинобактерий рода *Rhodococcus*, принадлежащие к видам *R. erythropolis* (16 штаммов), *R. fascians* (8 штаммов), “*R. longus*” (10 штаммов), *R. opacus* (7 штаммов), *R. rhodochrous* (10 штаммов), *R. ruber* (25 штаммов) и поддерживаемые в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (акроним ИЭГМ; #768 во Всемирной Федерации коллекций культур (WFCC); www.iegml.ru/iegmlcol). Клетки родококков выращивали в мясопептонном бульоне (“Oxoid”, Великобритания) при 28°C в течение 48 ч на орбитальной качалке (160 об/мин).

Определение степени адгезии клеток родококков к n-гексадекану. Адгезивную активность родококков в отношении n-гексадекана (99.9%, “Sigma”, США) определяли с помощью МАГН-теста (Microbial Adhesion to Hydrocarbons) [11]. Бактериальную культуру центрифугировали (3000 g, 15 мин) и дважды отмывали буферным раствором следующего состава (г/л): K₂HPO₄ · 3H₂O – 22.2, KH₂PO₄ – 7.26, NH₄NO₃ – 1.8, MgSO₄ · 7H₂O – 0.2, pH 7.1. Клетки ресуспендировали в данном буфере до достижения значения оптической плотности ОП_{600 нм} 0.5 (спектрофотометр Lambda EZ 201, “Perkin Elmer”, США). В обезжиренные пробирки вносили 4.8 мл клеточной суспензии и 1.2 мл n-гексадекана. Содержимое пробирок интенсивно встряхивали в течение 2 мин (Vortex FS 16, “BioSan”, Латвия). После отстаивания смеси в течение 1 сут измеряли оптическую плотность водной фазы при 600 нм. Процент адгезированных клеток определяли по разнице показателя оптической плотности исходной суспензии и таковой после смешивания с углеводородом. Все эксперименты проводили в 6-кратной повторности. В качестве контролей использовали суспензию клеток

без добавления *n*-алкана, а также стерильный буфер с добавлением углеводов.

Синтез частично гидрофобизованных производных криоПААГ. Использовали акриламид (ААМ), аллил-глицидиловый эфир (АГЭ), персульфат калия (ПСК), додецилмеркаптан (ДДМ), 2-меркаптоэтанол (2-МЭ) (все “Aldrich”, США); *N,N'*-метиленис-акриламид (МБААМ) и *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (ТМЭДА) (оба “Sigma”, США). Растворы готовили на бидистиллированной воде.

Широкопористый криоПААГ получали в неглубоко замороженной реакционной системе сополимеризацией ААМ, АГЭ и МБААМ при иницировании окислительно-восстановительной парой ТМЭДА+ПСК, после чего осуществляли модификацию носителя по его эпоксидным группировкам обработкой раствором ДДМ (рис. 1). В 118 мл воды растворяли 4.944 г ААМ и 0.36 г МБААМ, охлаждали полученный раствор в ледяной бане до 2–4°C и продували через него аргон в течение 25 мин. Далее прибавляли АГЭ в количестве, отвечающем либо 0.2, либо 1, либо 5 мол. % по отношению к количеству ААМ (0.016, 0.08 и 0.4 мл соответственно), а затем вносили 0.14 мл ТМЭДА и 2 мл водного раствора, содержащего 0.05 г ПСК. Реакционную массу быстро набирали в 5 мл пластиковые шприцы, которые погружали в жидкий азот на 5 с для иницирования кристаллизации льда и потом переносили в камеру прецизионного программируемого криостата FP 45 МН (“Julabo”, Германия), где их выдерживали при –12°C в течение 24 ч. Замороженные препараты оттаивали при комнатной температуре и затем промывали в проточном режиме, пропуская через шприцы по 100 мл дистиллированной воды. Последующую модификацию эпоксисодержащего криоПААГ также осуществляли в проточном режиме, для чего через каждый шприц со столбиком криогеля пассивно пропускали 30 мл водного раствора ТМЭДА (~рН 10), далее 50 мл 1%-ного раствора ДДМ в таком же растворе ТМЭДА и затем инкубировали в стационарном режиме 16 ч при комнатной температуре. Модифицированный широкопористый носитель промывали дистиллированной водой (по 150 мл на колонку).

Для получения контрольных (негидрофобизованных) носителей модификацию эпоксисодержащего криогеля проводили в 1%-ном растворе 2-МЭ (в этом случае в структуру криогеля вводятся гидрофильные гидроксиэтильные группировки) в условиях, аналогичных модификации полимерной матрицы с помощью ДДМ.

Скорость протока (мл/ч) жидкости через криогель определяли по объему дистиллированной воды, прошедшей через колонку за 1 ч при перепаде давления 100 см водяного столба. Для изучения морфологии криогелей соответствующие образцы были синтезированы в виде плоских дисков толщиной 2 мм, которые затем просматривались с помощью оптического микроскопа Eclipse 55i (“Nikon”, Япония),

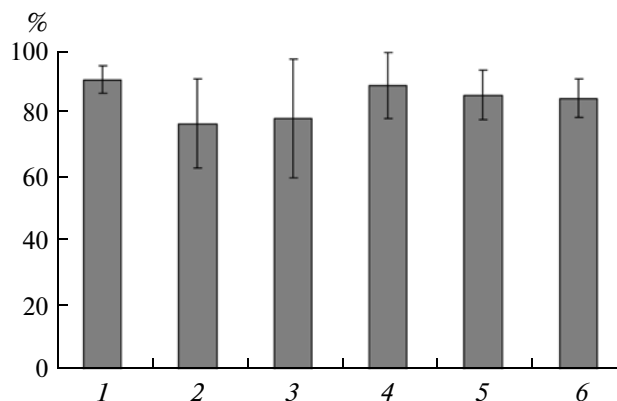


Рис. 2. Степень адгезии (%) клеток актинобактерий рода *Rhodococcus* к *n*-гексадекану (в скобках – число исследованных штаммов): 1 – *R. ruber* (24), 2 – *R. rhodochrous* (7), 3 – *R. erythropolis* (14), 4 – “*R. longus*” (7), 5 – *R. fascians* (6), 6 – *R. opacus* (5). Приведены средние для вида значения степени адгезии.

оборудованного системой цифровой записи изображения.

Адсорбция клеток родококков на колонках с гидрофобизованными производными криоПААГ. Бактериальную культуру центрифугировали при 3000 *g* в течение 15 мин. Клетки дважды отмывали фосфатным буфером следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 3.39; Na_2HPO_4 – 8.90, рН 7.1 и ресуспендировали в данном буфере до достижения оптической плотности D_{600} 0.5 (спектрофотометр Lambda EZ 201, “Perkin Elmer”, США).

Определение сорбционной емкости синтезированных широкопористых носителей в отношении клеток родококков проводили путем пассивного пропускания 150 мл клеточной суспензии через колонку с последующим отмыванием несорбированных клеток фосфатным буфером до достижения $\text{OP}_{600 \text{ нм}}$ элюата, равной нулю. Степень адсорбции клеток родококков вычисляли по разнице D_{600} суспензии клеток до и после прохождения через колонку, учитывая разбавление элюата. В каждом варианте опыта использовали 3 идентичные криоПААГ-колонки с одинаковой степенью гидрофобности (СГ), а также 3 контрольные (обработанные 2-МЭ) криоПААГ-колонки.

Оценка жизнеспособности и каталитической активности иммобилизованных и свободных клеток. Определение числа жизнеспособных иммобилизованных клеток родококков проводили модифицированным методом [12]. В колонки с адсорбированными клетками вносили 4.5 мл 0.2%-ного водного раствора йоднитротетразолия фиолетового (ИНТ) (“Sigma”, США). Через несколько минут наблюдали появление красно-фиолетового окрашивания в результате восстановления ИНТ до нерастворимого в воде формазана. Для полного восстановления красителя колонки инкубировали при комнатной тем-

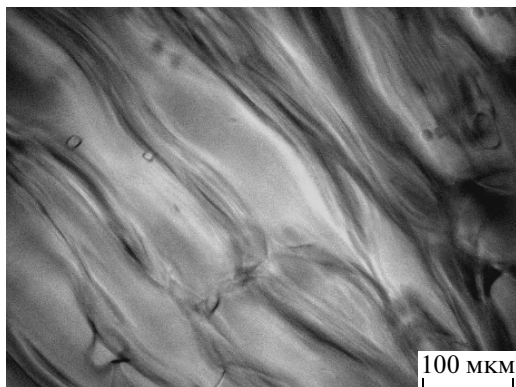


Рис. 3. Микрофотография (оптический микроскоп Eclipse 55i, “Nikon”, Япония) контрольного (негидрофобизованного) образца криоПААГ, сформированного в виде диска толщиной 2 мм. Хорошо видна широкопористая структура гелевого матрикса.

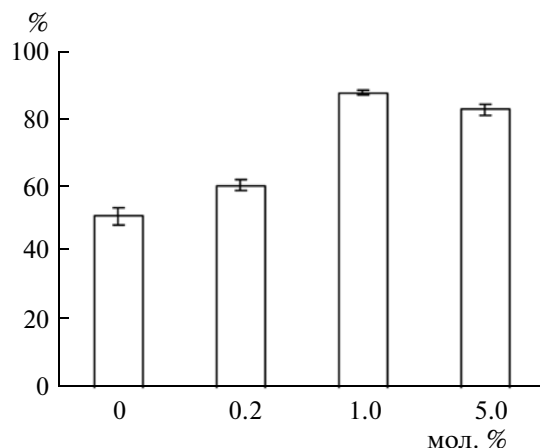


Рис. 4. Адсорбция клеток (%) *R. ruber* ИЭГМ 231 на криоПААГ-колонок с различной СГ (содержание додецильных заместителей: 0, 0,2, 1,0 и 5,0 мол. %). Приведены средние данные 3 параллельных экспериментов с использованием аналогичных колонок.

пературе в течение 1 сут. Окрашенные криогели осторожно переносили из колонок в 100 мл колбы Эрленмейера, измельчали металлическим шпателем и заливали 75 мл этилацетата (ч.д.а., “Компонент-Реактив”, Москва). Для полной экстракции формазана содержимое колб подвергали УЗ-обработке (Soniprep 150, “SANYO”, Япония) в течение 20 мин и инкубировали при 28°C на орбитальной качалке (160 об/мин) в течение 1 сут. Экстракцию формазана повторяли 2–3 раза до обесцвечивания этилацетата. Полученные из одной колбы экстракты объединяли и определяли ОП_{480 нм}. Число жизнеспособных клеток родококков рассчитывали по калибровочному графику зависимости ОП_{480 нм} раствора формазана от концентрации клеток, определенной высевом на МПА.

Хранение клеток родококков, заключенных в гидрофобизованные производные криоПААГ, осуществляли при +5°C. Число жизнеспособных клеток определяли сразу после иммобилизации и после 6 мес хранения.

Каталитическую активность и функциональную стабильность иммобилизованных клеток родококков определяли с помощью 6-канального респирометра Columbus Micro-Oxymax® (“Columbus Instruments”, США). Оценивали скорость дыхания (мкл/мин), а также количество потребленного кислорода и углекислого газа (мкл) иммобилизованными и свободными клетками родококков в присутствии модельной нефти, в качестве которой [13] использовали 2%-ную водную эмульсию смеси углеводородов (н-декан, н-ундекан, н-додекан, н-тетрадекан, н-гексадекан, н-гептадекан, н-нонадекан – по 12%, пристан – 6%, нафталин, аценафтен, фенантрен, антрацен – по 2%), стабилизированную 0,1%-ным раствором Твин-60. Углеводородную эмульсию подвергали УЗ-обработке (Soniprep

150, “SANYO”, Япония) в течение 2 мин и вносили в криоПААГ-колонки с иммобилизованными клетками родококков. Параллельно в пробирках, одинаковых по размеру с колонками, готовили клеточные суспензии родококков в углеводородной эмульсии таким образом, чтобы концентрация свободных клеток была равной концентрации иммобилизованных клеток в соответствующей криоПААГ-колонке. Колонки и пробирки с клеточными суспензиями помещали в камеры респирометра и проводили измерение клеточного дыхания при 28 ± 1°C каждые 42 мин в течение 1–5 сут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно [11], что адгезия микроорганизмов к жидким углеводородам, т.е. способность аккумулироваться на разделе фаз “вода–масло”, определяется гидрофобными свойствами их клеточной поверхности. Поэтому определение показателя микробной адгезии к углеводородам в МАТН-тесте часто используется в качестве простого и экспрессного метода оценки СГ микробных клеток [14]. Результаты определения адгезивной активности клеток родококков различных видов в отношении н-гексадекана (рис. 2) свидетельствуют о высокой (>60%) степени их адгезии к углеводороду, характерной практически для всех исследуемых представителей рода *Rhodococcus*. При этом максимальные значения (80–98%) показателя адгезии к н-гексадекану наблюдались у представителей видов *R. ruber*, “*R. longus*”, *R. fascians* и *R. opacus*. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее [10] и литературными [15–17] данными о повышенном по сравнению с другими бактериями средстве клеток родококков к гидрофобным субстратам. Так, при росте родококков на средах с жидкими и газообразными углеводородами

родами индуцируется избыточный синтез липидных компонентов клеточной стенки [18], что способствует гидрофобизации клеточной поверхности и, как следствие, возрастанию степени адгезии клеток к углеводородным субстратам.

На основании полученных результатов по адгезии нами [10] был предложен метод селективного выделения клеток родококков из смешанных микробных популяций с использованием сорбционной колонки на основе криоПААГ. В качестве гидрофобизирующих группировок для увеличения сродства клеток родококков к криоПААГ в структуру гидрофильного носителя реакцией с додециловым альдегидом вводились остатки *n*-додекана, способствующего значительной (96%) степени адгезии [10] и относительно нетоксичного для бактериальных клеток [19]. В настоящем исследовании с целью повышения числа адсорбированных на гелевом носителе клеток родококков испытаны криоПААГ-колонки с различной СГ, для чего были синтезированы широкопористые носители, содержащие 0.2, 1 и 5 мол. % эпоксидных звеньев, по которым далее осуществлялась прививка додецильных остатков с помощью ДДМ (рис. 1).

Поскольку криоПААГ и его частично гидрофобизованные производные обладают системой взаимосвязанных крупных пор (рис. 3), то такие носители, сформированные в виде непрерывной пористой насадки непосредственно внутри колонки, свободно пропускают не только жидкие среды [20], но и суспензии клеток [6, 7], что позволяет проводить адсорбционную иммобилизацию в проточном режиме без необходимости “изготовления” гранулированного носителя или измельчения цельного блока. У полученных в настоящей работе колонок с криоПААГ скорость протока воды составляла 410 ± 10 мл/ч при перепаде давления 100 см водяного столба.

Анализ влияния степени гидрофобизации носителя на адсорбцию бактерий показал (рис. 4), что число прочно закрепленных (не отмываемых фосфатным буфером) клеток родококков возрастало на 30% при повышении содержания остатков *n*-додекана в криоПААГ от 0.2 до 1 мол. % и достигало 89% адсорбированных клеток (1.12×10^9 кл./г носителя). Данный показатель в 1.7 раз превышал контрольное значение (степень адсорбции родококков на негидрофобизованной криоПААГ-колонке составляла 52%). В то же время дальнейшее повышение СГ криогеля (до 5 мол. % привитых додецильных группировок) не приводило к увеличению числа адсорбированных клеток (1.06×10^9 кл./г носителя), что свидетельствует о достижении максимальной сорбционной емкости такого гидрофобизованного носителя в отношении клеток *R. ruber*.

Аналогичный эффект наблюдался нами ранее [21] при избыточной гидрофобизации носителя на основе древесных опилок, приводящей к снижению числа иммобилизованных клеток родококков, что наглядно свидетельствует о необходимо-

Эффективность десорбции (%) клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 из гидрофобизованных криоПААГ-колонок

Десорбирующий агент, раствор	КриоПААГ с содержанием додецильных группировок, мол. %			
	0	0.2	1.0	5.0
1 М NaCl	0	0	0	0
Этанол, 20%-ный	0.9	1.7	1.1	2.3
Твин-80, 0.1%-ный	29.1	24.4	3.4	0.9
Твин-80, 1%-ный	38.1	26.6	5.0	2.0

сти оптимизации СГ носителей, которые используются для адсорбционной иммобилизации микроорганизмов, основанной на гидрофобных взаимодействиях клеток с поверхностью носителя. Наблюдаемая в контрольном (негидрофобизованном) криогеле адсорбция клеток, по-видимому, объясняется морфологическими особенностями родококков (палочковидные клетки длиной до 15 мкм, наличие выростов клеточной стенки [22]). Таким образом, умеренная гидрофобизация криоПААГ способствовала существенному (на 37%) увеличению числа адсорбированных клеток родококков, что свидетельствует о важной роли гидрофобных взаимодействий в процессе адсорбции данных бактерий.

Промывание колонок с иммобилизованными клетками родококков 1 М NaCl и 20%-ным этанолом не приводило к десорбции прикрепленных клеток (таблица), однако родококки частично вымывались 0.1- и 1%-ными растворами Твин-80. При этом эффективность десорбции клеток зависела в большей степени от гидрофобности носителя, чем от концентрации раствора Твин-80. Так, из колонки с наименее гидрофобным криоПААГ вымывалось 24–27% адсорбированных клеток, а из более гидрофобизованных носителей – всего 1–5%, что

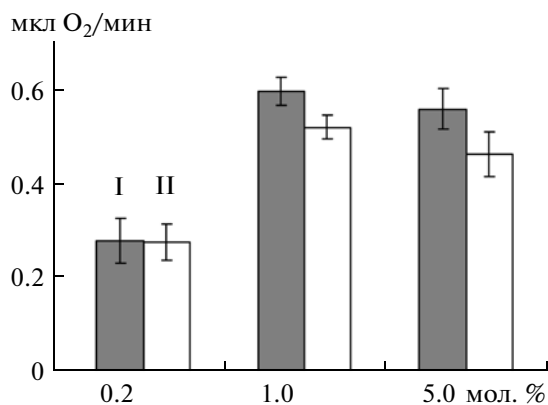


Рис. 5. Скорость потребления кислорода адсорбированными на гидрофобизованных криоПААГ-колонках (I) и свободными (II) клетками родококков в присутствии модельной нефти: криоПААГ с содержанием додецильных группировок (0.2, 1.0 и 5.0 мол. %). Представлены средние значения измерения скорости дыхания за 5 ч.

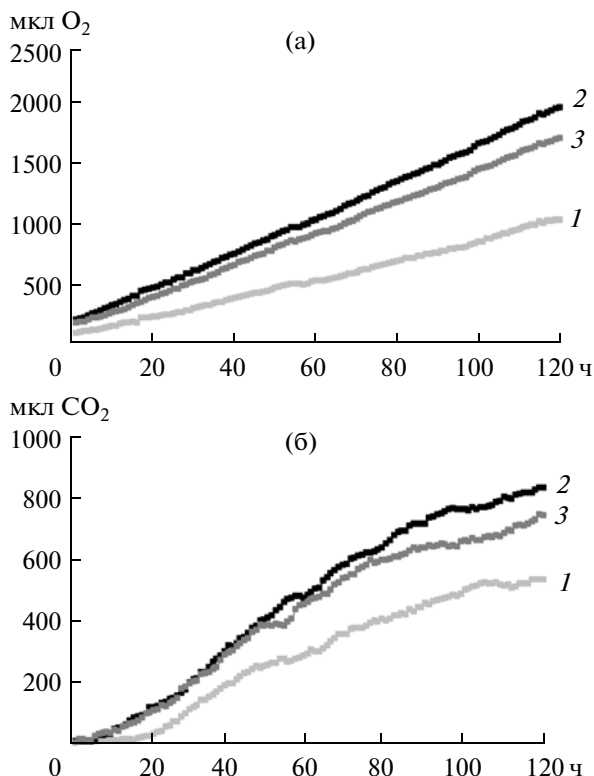


Рис. 6. Динамика потребления O_2 (а) и выделения CO_2 (б) адсорбированными на гидрофобизованных криоПААГ-колонках клетками родококков в присутствии модельной нефти: криоПААГ с содержанием додецильных группировок: 0.2 (1), 1.0 (2), 5.0 мол. % (3).

указывало на более сильное удерживание гидрофобных клеток *R. ruber*. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований по оптимизации процедуры десорбции клеток родококков из криоПААГ-колонок с учетом гидрофобной природы их взаимодействия с гелевым носителем.

Дыхательную активность можно рассматривать как показатель жизнеспособности бактериальных клеток и интенсивности протекающих в них метаболических процессов [23]. Нами при изучении процесса дыхания клеток *R. ruber* ИЭГМ 231, адсорбированных на гидрофобизованных производных криоПААГ, показано (рис. 5), что наиболее высокая скорость потребления O_2 в присутствии модельной нефти наблюдалась у родококков на колонке с криоПААГ, модифицированным 1 мол. % додецильных группировок, что совпадало с наибольшей концентрацией иммобилизованных на данном носителе клеток (рис. 4). Замечено также, что скорость потребления O_2 адсорбированными бактериальными клетками на 12–17% превышала таковую свободных клеток. Это было выявлено для криоПААГ с содержанием 1 и 5 мол. % гидрофобных заместителей. Поскольку в экспериментах по измерению интенсивности дыхания использовали равное количество

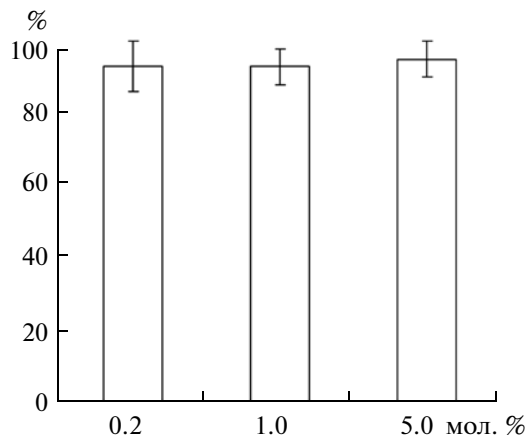


Рис. 7. Жизнеспособность (%) адсорбированных на гидрофобизованных криоПААГ-колонках клеток родококков после полугодового хранения: криоПААГ с содержанием додецильных группировок (0.2, 1.0 и 5.0 мол. %). Приведены средние данные 3 параллельных экспериментов с использованием аналогичных колонок.

клеток в криоПААГ-колонках и соответствующих клеточных суспензиях, выявленный факт, вероятно, объясняется повышенной метаболической активностью закрепленных в криогеле клеток родококков. В обзоре [4] обсуждаются возможные механизмы повышения метаболической активности иммобилизованных микроорганизмов, обусловленные модификацией микроокружения клеток, изменением их морфологии, повышенной стабильностью плазмид, а также устойчивостью к негативным внешним воздействиям. Очевидно, адсорбированные в криоПААГ клетки родококков более устойчивы к токсическому действию углеводов, входящих в состав модельной нефти, чем свободные клетки. Ранее нами было показано [24], что клетки родококков, иммобилизованные в криогеле поливинилового спирта, в 2.4 раза эффективнее окисляли *n*-гексадекан по сравнению с клеточными суспензиями.

Динамика дыхательной активности иммобилизованных клеток *R. ruber* в присутствии углеводов нефти (рис. 6) характеризовалась стабильным потреблением O_2 и выделением CO_2 в течение всего срока наблюдений (120 ч), что указывало на функциональную стабильность закрепленных в криоПААГ клеток родококков. Более того, жизнеспособность иммобилизованных клеток родококков после длительного (0.5 г) периода хранения составляла 93–95% (рис. 7).

Таким образом, на основании полученных данных показана перспективность использования гидрофобизованного носителя на основе криоПААГ для иммобилизации и концентрирования клеток родококков. Определено оптимальное содержание (1 мол. %) додецильных заместителей в данном широкопористом носителе, обеспечивающее наибольшую адсорбционную емкость системы в отношении

углеводородоокисляющих родококков. Выявлена высокая каталитическая активность и функциональная стабильность закрепленных в частично гидрофобизованном криоПААГ клеток родококков. Показана возможность длительного хранения иммобилизованных клеток без потери их жизнеспособности. Полученные данные могут быть использованы при разработке эффективного биокатализатора для направленной трансформации углеводородных соединений и биоочистки нефтезагрязненной воды.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ “Ведущие научные школы” НШ-64403.2010.4 и Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ivshina I.B.* // WFCC Newslett. 2001. № 33. P. 8–14.
2. *Van der Geize R., Dijkhuizen L.* // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. 7. № 3. P. 255–261.
3. *Ившина И.Б., Гришко В.В., Ноговицина Е.М., Кукина Т.П., Толстиков Г.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 626–633.
4. *Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T.* // J. Ind. Microbiol. 1996. V. 16. № 2. P. 79–101.
5. *Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д.* Иммобилизованные клетки микроорганизмов. 2-е изд. М.: МГУ, 1994. 288 с.
6. *Лозинский В.И.* // Изв. РАН. Сер. хим. 2008. № 5. С. 996–1013.
7. *Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattiasson B.* // Trends Biotechnol. 2003. V. 21. № 10. P. 445–451.
8. *Лозинский В.И., Корнеева М.Н., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270. № 1. С. 101–104.
9. *Луста К.А., Старостина Н.Г., Горкина Н.Б., Фихте Б.А., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1988. Т. 24. № 4. С. 504–513.
10. *Kuyukina M.S., Rubtsova E.V., Ivshina I.B., Ivanov R.V., Lozinsky V.I.* // J. Microbiol. Methods. 2009. V. 79. № 1. P. 76–81.
11. *Rosenberg M.* // FEMS Microbiol. Lett. 1984. V. 22. № 3. P. 289–295.
12. *Wrenn B.A., Venosa A.D.* // Can. J. Microbiol. 1996. V. 42. № 3. P. 252–258.
13. *Walker J.D., Colwell R.R.* // Appl. Environ. Microbiol. 1974. V. 27. № 6. P. 1053–1060.
14. *Rosenberg M.* // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 262. № 2. P. 129–134.
15. *Bouchez-Nantali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J.-P.* // J. Appl. Microbiol. 1999. V. 86. № 3. P. 421–428.
16. *Dorobantu L.S., Yeung A.K.C., Foght J.M., Gray M.R.* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 10. P. 6333–6336.
17. *Hamada T., Sameshima Y., Honda K., Omasa T., Kato J., Ohtake H.* // J. Biosci. Bioeng. 2008. V. 106. № 4. P. 357–362.
18. *Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рычкова М.И., Чумаков О.Б.* // Микробиология. 2000. Т. 69. № 1. С. 62–69.
19. *Sikkema J., de Bont J., Poolman B.* // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. № 2. P. 201–222.
20. *Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Ivanova S.A., Titova E.F., Shtil'man M.I., Belavtseva E.M., Rogozhin S.V.* // Acta Polymerica. 1986. Т. 37. № 3. С. 142–146.
21. *Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivorutchko A.V., Philp J.C., Cunningham C.J.* // Biores. Technol. 2008. V. 99. № 6. P. 2001–2008.
22. *Ившина И.Б., Бердичевская М.В., Зверева Л.В., Рыбалка Л.В., Еловицкая Е.А.* // Микробиология. 1995. Т. 64. № 4. С. 507–513.
23. *Steininger C., Allerberger F., Gnaiger E.* // J. Antimicrob. Chemother. 2002. V. 50. № 4. P. 517–523.
24. *Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Gavrin A.Yu., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Jeffree C.E., Philp J.C.* // J. Microbiol. Methods. 2006. V. 65. № 3. P. 596–603.

Adsorptive Immobilization of Rhodococcal Cells in Hydrophobized Derivatives of Wide-Pore Polyacrylamide Cryogel

M. S. Kuyukina^a, I. B. Ivshina^a, E. V. Rubtsova^a, R. V. Ivanov^b, and V. I. Lozinsky^b

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Division, Russian Academy of Sciences, ul. Goleva 13, Perm, 614081 Russia

e-mail: kuyukina@iegm.ru

^b Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia

Received June 13, 2010

Abstract—Adsorption of *Rhodococcus ruber* cells on columns with polyacrylamide cryogel (CryoPAAG) partially hydrophobized by different quantities (0.2, 1, and 5 mol %) of chemically grafted n-dodecane residues has been studied. The adsorption capacity (1.1×10^9 cells/g) of gel carrier for rhodococcal cells and the optimal content (1 mol %) of hydrophobizing groups were determined. The respirometric method showed the high catalytic activity and functional stability of immobilized bacterial cells. Respiratory activity of immobilized rhodococci in the presence of a model mixture of oil hydrocarbons exceeded the respective parameter for free cells by 12–17%. Viability of rhodococcal cells adsorptionally fixed in hydrophobized cryoPAAG was maintained at a level of 93–95% after a half-year period of storage. The results may be used for development of immobilized biocatalyst for directed transformation of hydrocarbon compounds and biological purification of oil-polluted water.