

ЭКОЛОГИЯ

УДК 579.6

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
В БИОТЕХНОЛОГИИ

С.Г. Васильева*, Е.С. Лобакова, А.А. Лукьянов, А.Е. Соловченко

Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

* e-mail: vankat2009@mail.ru

Рассматривается иммобилизация клеток кислородных фототрофных микроорганизмов — цианобактерий и эукариотических микроводорослей — в природе и в искусственных системах. В обзоре подчеркивается, что существование клеток микроорганизмов в прикрепленном состоянии, например, в составе биопленок, является широко распространенной в природе стратегией, обеспечивающей выживание клеток. Таким образом, искусственно иммобилизованные клетки кислородных фототрофных микроорганизмов можно рассматривать как особую группу биомиметических материалов. Особое внимание уделено изучению влияния различных способов иммобилизации на физиологическое состояние клеток цианобактерий и микроводорослей, их устойчивость к стрессовым воздействиям, а также продуктивность культур, находящихся в иммобилизованном состоянии. В обзоре проводится анализ преимуществ и недостатков современных методов иммобилизации и используемых в настоящее время носителей. Освещаются возможности применения иммобилизованных культур кислородных фототрофных микроорганизмов в различных областях биотехнологии, таких как получение биомассы и ценных метаболитов, сбор биомассы, очистка водных акваторий и сточных вод от тяжелых металлов, избытка биогенных элементов и органических загрязнителей.

Ключевые слова: иммобилизация, микроводоросли, цианобактерии, биотехнология, биопленки, обзор.

В естественных условиях многие кислородные фототрофные микроорганизмы, включая цианобактерии и эукариотные микроводоросли (далее — МВ), существуют в виде сообществ (ассоциаций) с гетеротрофными и другими МВ. Такие ассоциации часто оформлены морфологически в агрегаты, кластеры, хлопья, гранулы, то есть в виде прикрепленных или взвешенных в водной среде сообществ [1], в которых клетки заключены в матрикс из внеклеточных биополимеров. Следовательно, существование клеток МВ в иммобилизованном состоянии можно считать универсальной формой их существования, в которой микроорганизмы, иммобилизованные в биополимерном матриксе, функционируют как согласованно действующий многоклеточный организм [1].

В настоящее время интенсивно развиваются биотехнологии на основе иммобилизованных культур МВ. Клетки, закрепленные на поверхности и (или) в объеме различных носителей широко применяются для получения биомассы и метаболитов, очистки сточных вод от избытка биогенных элементов и тяжелых металлов [2–3]. Преимущества иммобилизованных клеток по сравнению с клеточными суспензиями — упрощение сбора биомассы и повышение устойчивости клеток к действию неблагоприятных факторов (температура, кислотность, токсические соединения).

Настоящий обзор призван систематизировать данные о методах иммобилизации, используемых носителях, влиянии иммобилизации на физиологическое состояние клеток, а также о преимуществах и недостатках использования иммобилизованных культур МВ в различных биотехнологических процессах в сравнении со свободными культурами.

Природные биопленки как прообраз иммобилизованной культуры микроводорослей

Формирование устойчивых альгобактериальных ассоциаций в природе связано с тем, что МВ являются центрами формирования устойчивых продуктивных систем. Их центральная роль определяется наличием сложноорганизованных поверхностных структур (слизистых капсул, чехлов, колониальной слизи), а также способностью к выделению различных органических соединений, поддерживающих рост и физиологическую активность компонентов формирующегося сообщества. В ассоциациях интегрированные во внеклеточный матрикс клетки микроорганизмов ограничены в подвижности и сконцентрированы в ограниченном объеме, т.е. находятся в природном иммобилизованном состоянии [4].

В сообществах с участием МВ между его компонентами формируются различные типы связей — трофические, пространственные, защитные, а регуляторной основой их стабильности является

межклеточная коммуникация. Примерами таких сообществ являются строматолиты и современные цианобактериальные маты — древнейшая (3,5 млрд лет) эволюционно успешная форма жизни [5]. В современной литературе такие ассоциации (сообщества) микроорганизмов в широком смысле обозначают термином “биопленка” [6].

Образование биопленок — основная стратегия выживания микроорганизмов в природных условиях

Около 99% всех прокариот существует в форме биопленок, образование которых представляет сложный, строго регулируемый биологический процесс. Интегрированные в биопленку микроорганизмы защищены от неблагоприятных физических, химических и биологических факторов внешней среды — экстремальных температур, обезвоживания, ультрафиолетового излучения, дефицита питательных веществ, токсиантов, получая возможность существовать в относительно постоянных условиях [7]. Формирование биопленочных сообществ является основой стратегии выживания микроорганизмов в природных условиях.

Коммуникация между микроорганизмами в биопленках осуществляется посредством химических сигналов, регулирующих экспрессию генов у составляющих биопленку микроорганизмов, что позволяет клеткам контролировать собственную структуру, морфогенез и адаптацию [8]. Биополимерный матрикс состоит, главным образом, из полисахаридов и белков (в сумме до 85%), формирующих полианионные гидрогелевые матрицы, а также незначительного количества нуклеиновых кислот и липидов [6].

В биопленках реализуется основной принцип эволюционного развития микроорганизмов — принцип кооперативного существования [9], когда продукты жизнедеятельности одного вида служат питательной средой для другого, а микроорганизмы одного или разных видов взаимодействуют с помощью специальных сигнальных систем [10].

Примером природной иммобилизации может служить заселение клетками МВ поверхности прозрачных гелеобразных структур животных, обитающих в фотической зоне — гидроидов, моллюсков, круглых червей и других. *In hospite* МВ обеспечивают животных питательными веществами, участвуют в синтезе защитных слизей, соединений химической защиты, минерализации внешних покровов, участвуют в защитной пигментации животного. В свою очередь, животные предоставляют МВ среду обитания, защиту от неблагоприятных факторов внешней среды и, что особенно важно, доставляют клетки МВ к свету [11].

Можно предположить, что иммобилизация МВ в искусственных системах, будет повышать устойчивость клеток к стрессовым воздействиям и обеспечивать преимущества по сравнению с применением суспензионных культур.

Способы иммобилизации МВ

Иммобилизацией называют процесс закрепления клеток на носителе либо заключение их в объеме последнего [12]. При включении клеток в состав полимерных гранул удается достичь более высокой удельной концентрации зафиксированных клеток по сравнению с иммобилизацией на поверхности. Кроме того, заключенные в объеме полимера клетки защищены от контаминации посторонними микроорганизмами [13].

Условия иммобилизации и носители должны обеспечивать минимальное повреждение клеток и препятствовать диффузии. Большинство стандартных методов иммобилизации микроорганизмов потенциально пригодно и для МВ, если их клетки будут получать достаточно света.

Носители для иммобилизации

Носители для иммобилизации микроорганизмов подразделяют на природные и синтетические. Примерами природных носителей служат нерастворимые материалы, к которым клетки прикрепляются в естественных условиях (древесина, шерсть, минералы). Преимуществами природных носителей являются гидрофильность, биосовместимость, простота утилизации, а недостатками — низкая стабильность и высокая себестоимость. В качестве носителей для иммобилизации МВ часто используют субстраты из плодов люфы, сфагнум, торф, стекло, пластик, дерево, натуральные полисахариды (агар-агар, целлюлозу, альгинат, каррагинан, хитозан), синтетические полимеры (полиакриламид, полиуретан, поливинилхлорид, полипропилен, полисульфон, эпоксидная смола) [14, 15].

Идеальный носитель для клеток МВ не должен угнетать их жизнедеятельность, а также препятствовать массообмену и блокировать свет. Носитель должен обладать высокой механической, химической и биологической стойкостью, а также технологичностью. Кроме того, он должен быть недорогим, надежно удерживать клетки и обладать высокой гидрофильностью (без нее невозможны реакции в водной среде).

Методы иммобилизации

В настоящее время выделяют две группы методов иммобилизации: пассивные и активные. Пассивная иммобилизация базируется на естественной способности микроорганизмов закрепляться на твердых или гелеобразных носителях [16]. Это простейший способ иммобилизации клеток микроорганизмов, не вызывающий клеточного стресса и имитирующий процесс прикрепления клеток в природе.

Напротив, активные методы иммобилизации не зависят от естественной способности клеток МВ прикрепляться к какой-либо поверхности и включают два основных подхода:

– ковалентное связывание клеток с поверхностью носителя с помощью “сшивающих” агентов, например, глутаральдегида;

– включение клеток микроорганизмов в массу носителя, например, заключение в альгинатные гранулы [16].

Пассивная иммобилизация. Естественное прикрепление клеток МВ к твердым и гелеобразным поверхностям обусловлено химическими (ковалентными) и физическими (ионными, электростатическими, гидрофобными) механизмами [13]. Для иммобилизации используются синтетические и природные материалы, например, обработанные плоды люфы [17]: они достаточно пористые, биоразлагаемые, нетоксичные и дешевые. Травесо и соавт. [18] использовали пенополиуретановые кубики объемом 1 см³ как носитель для клеток *Scenedesmus quadricauda* при очистке сточных вод. Те же авторы предложили конструкцию биореактора с вращающимся барабаном из пенополиуретана для биоизъятия из сточных вод тяжелых металлов. Пассивные методы иммобилизации также применяются с такими носителями, как стекло, пластик и дерево, особенно в экологических, экотоксикологических и биотехнологических исследованиях [19–21].

Активная иммобилизация. При ковалентном связывании клеток используются как синтетические, так и природные материалы, такие как хитин или хитозан. Однако этот тип активной иммобилизации предполагает использование токсичных бифункциональных реагентов (диальдегиды, диизоцианаты), поэтому он больше подходит для закрепления мертвых клеток [16].

Для иммобилизации в объеме носителя чаще всего используют природные полимеры, например, агарозу и агаропектин. К преимуществам агара относятся нетоксичность, низкая температура плавления и способность формировать механически прочные гели даже в малых концентрациях [22], поэтому применение иммобилизации клеток в агаре получило широкое распространение [23].

Метод иммобилизации МВ с использованием гранул альгината кальция также является одним из наиболее широко используемым в настоящее время [3]. Рост клеток МВ в составе гранул не лимитирован интенсивностью света [23], и они не токсичны для клеток МВ [24–26], однако такие носители частично разрушаются в морской воде и сточных водах. В настоящее время также широко используются каррагинаны, несмотря на меньшую устойчивость в водных средах по сравнению с альгинатами.

Влияние иммобилизации на клетки микроводорослей

Способность клеток МВ к закреплению на поверхности различных носителей во многом определяется возрастом, состоянием культуры и составом среды культивирования. Эта способность макси-

мальна у клеток в экспоненциальной фазе роста, в стационарной фазе она, как правило, снижается [27].

У иммобилизованных клеток МВ отмечен рост содержания пигментов, а также изменения в количестве и составе липидов и жирных кислот по сравнению со свободноживущими клетками [14, 28]. Так, содержание хлорофилла в клетках *Chlorella vulgaris*, иммобилизованных в каррагинановом геле, вдвое выше, чем в суспензионной культуре [28], а клетки *Botryococcus braunii* и *B. protuberans*, находящиеся в альгинатных гранулах, отличаются большим содержанием хлорофиллов, каротиноидов и липидов по сравнению со свободными клетками [29]. При совместной иммобилизации микроводоросли *Chlorella* spp. и бактерии *Azospirillum brasilense* также наблюдается увеличение содержания пигментов и липидов в клетках микроводоросли [30].

Иммобилизация может быть сильным стрессором для клеток МВ, приводящим к снижению количества живых клеток. Это снижение может впоследствии компенсироваться, если иммобилизованные клетки не потеряли способность к делению [14]. Установлено, что клетки *Skeletonema costatum* и *Heterocapsa* sp. внутри альгинатных гранул не делятся, тогда как скорость роста ряда других МВ не отличается от таковой в суспензии [31].

В некоторых случаях, например у *Chlorella minutissima*, *Pavlova lutheri*, *Haematococcus pluvialis* и *Dunaliella bardawil*, закрепленных в 2%-ном геле карбоксиметилцеллюлозы, иммобилизация стимулирует рост культур МВ [32]. Возможны и противоположные эффекты из-за токсичности полимеров и соединений, используемых для закрепления клеток [33, 34].

Как отмечено выше, иммобилизованные клетки становятся более устойчивыми к изменениям pH, температуры и ионной силы среды [13]. Так, иммобилизация клеток *Synechococcus* sp. в хитозане увеличивает устойчивость клеток к NaOH [35]. Отмечается также увеличение устойчивости клеток к действию различных токсичных веществ. Например, токсическое влияние ионов Ni и Cr на клетки азотфиксирующей цианобактерии *Aulosira fertilissima* значительно снижается при их иммобилизации в альгинатных гранулах [36].

Иммобилизации влияет и на метаболическую активность клеток: иммобилизованные в агаре клетки *Dunaliella salina* синтезировали больше глицерина в сравнении со свободными клетками [37], а клетки морской диатомовой водоросли *Haslea ostrearia* в агарозном геле увеличивали продукцию маренина, используемого для кормления устриц [38].

Имеются данные о значительных изменениях формы и увеличении размеров иммобилизованных клеток [39], трихомов и колоний [2].

Влияние иммобилизации на фотосинтетическую активность клеток МВ неоднозначно [39–41] и зависит от изменения эффективной освещенности клеток. В случае недостаточного, либо избыточного освещения иммобилизованных клеток скорость

фотосинтеза падает, но носитель может и защищать клетки от фотоповреждения, рассеивая избыточный свет. Фотосинтез может лимитироваться и недостатком CO_2 . В этом случае эффективна совместная иммобилизация МВ и гетеротрофных микроорганизмов, снабжающих микроводоросли углекислотой в процессе дыхания [16].

Применение иммобилизованных микроводорослей в биотехнологии

В настоящее время иммобилизованные клетки МВ находят широкое применение в биотехнологии получения биомассы, ценных метаболитов, биоводорода, очистки водных акваторий и сточных вод от тяжелых металлов, биогенных элементов и органических соединений, а также в качестве биосенсоров для оценки степени загрязненности водных сред [2, 14, 31]. Одна из сложных проблем биотехнологии с участием МВ — поиск оптимальных способов сбора урожая биомассы. Применяемые в настоящее время подходы (фильтрация, центрифугирование, флокуляция) являются энергозатратными и трудоемкими [42]. Использование иммобилизованных культур позволяет предельно упростить и удешевить сбор биомассы. Другие области применения подробнее освещаются в следующих разделах.

Получение биомассы и ценных метаболитов

Иммобилизованные клетки МВ — например, *Porphyridium cruentum*, применяются для получения сульфатированных полисахаридов [43]. Клетки цианобактерии *Aphanocapsa* MN-11, иммобилизованные в альгинатных гранулах, покрытых светорассеивающим оптическим волокном, экскретируют значительные количества сульфатированных полисахаридов [44]. Имеется описание получения алкалоида кодеина из морфина с помощью цианобактерии *Spirulina platensis*, иммобилизованной в альгинате [45]. Клетки азотфиксирующей цианобактерии *Anabaena azollae*, зафиксированные в полиуретановых гранулах, культивировали в фотобиореакторе для получения NH_3 . Изучается возможность использования указанной культуры, иммобилизованной на различных носителях, в качестве биоудобрения на рисовых полях [46].

Получение биоводорода

В настоящее время растет интерес к возобновляемым источникам энергии, таким как биоводород, выделяемый клетками МВ. Некоторые МВ на свету в стрессовых условиях (например, при отсутствии соединений серы в среде культивирования) способны выделять водород. Недостаток соединений серы блокирует синтез белков фотосинтетического аппарата, что приводит к снижению активности второй фотосистемы, индукции синтеза гидрогеназы и выделению водорода [47]. На сегодняшний день культура *Chlamydomonas reinhardtii*

является наиболее перспективным и изученным кандидатом для получения биоводорода в промышленных масштабах [48, 49]. У цианобактерий наиболее перспективным считается светозависимое выделение водорода гетероцистными видами, синтезирующими H_2 как побочный продукт их нитрогеназной активности. Существенно, что нитрогеназа в гетероцистах защищена от ингибирующего влияния кислорода [48]. Показано [50], что клетки *Anabaena* N-7363, иммобилизованные в 2%-ном геле каррагинана, выделяют в 2,4 раза больше водорода (до 3,24 ммоль в час на 1 г сухого геля) по сравнению со свободными клетками. Иммобилизация клеток *C. reinhardtii* в альгинатных гранулах снижает скорость инактивации гидрогеназы кислородом, так как слой альгината ограничивает поступление кислорода внутрь гранул. В результате клетки выделяют больше водорода в сравнении со свободными клетками [48]. У клеток *C. reinhardtii*, иммобилизованных на стеклянных волокнах, удлинняется период активного выделения водорода, однако скорость выделения водорода у свободных и иммобилизованных клеток не различается [49].

Очистка сточных вод от биогенных элементов

Биологическая очистка с применением МВ представляется одной из наиболее перспективных биотехнологий для очистки сточных вод (в том числе стоков сельскохозяйственных предприятий), позволяющей эффективно и экономично утилизировать сточные воды с минимальным ущербом для окружающей среды [51]. Культивирование МВ в сточных водах, содержащих биогенные элементы, такие как азот и фосфор, позволяет комбинировать очистку и получение биомассы [2]. Одним из наиболее перспективных способов утилизации биомассы МВ, обогащенной биодоступными формами азота и фосфора, является производство удобрений.

Для эффективного изъятия биогенных элементов в настоящее время предлагается использовать МВ, заключенные в природные и синтетические полимерные гели [2] или иммобилизованные на поверхности различных полимерных материалов [52]. Увеличение эффективности удаления биогенных элементов из сточных вод иммобилизованными клетками МВ может быть связано не только с увеличением их фотосинтетической активности, но и с адсорбцией биогенных ионов. Например, матрица из каррагинана адсорбирует катионы аммония, в то время как хитозан адсорбирует анионы (фосфат, нитрат, нитрит) [27]. Показано, что клетки *C. vulgaris*, иммобилизованные в альгинатных гранулах, способны использовать до 80% аммония и 70% фосфора из сточных вод [53]. Иммобилизованная на полиуретановом и поливиниловом носителе культура МВ *Phormidium laminosum* также успешно используется для удаления нитратов из среды [34]. Клетки цианобактерии *Phormidium* sp., иммобилизованные на поверхности хитозана (сорбирующего 60% ортофосфата из

среды культивирования в течение 4–6 ч), извлекают до 95% неорганического азота и 87% фосфатов в течение 24 ч [54].

При использовании клеток МВ, инкапсулированных в полимерные гранулы, следует учитывать, что при низких концентрациях биогенных элементов значительно снижается скорость их поступления внутрь гранул. Так, в работе [55] показано, что *C. reinhardtii*, иммобилизованные в альгинате кальция, не накапливают нитраты при их концентрации в среде ниже 0,14 ммоль/л, тогда как суспензионная культура этой МВ полностью извлекает нитраты.

Несмотря на ограниченный рост культуры в гранулах по сравнению с суспензией, метаболическая активность иммобилизованных клеток может быть выше, что способствует повышению полноты и скорости очистки сточных вод. Так, в течение 3 сут более 95% аммония и 99% фосфатов было использовано иммобилизованными клетками *C. vulgaris*, что вдвое выше, чем у свободных клеток [28].

Использование термофильных культур может повышать эффективность биоочистки, если температура очищаемых вод превышает 30°C. Так, цианобактерия *Phormidium laminosum* [56], иммобилизованная на пористых целлюлозных волокнах в трубчатых биореакторах, эффективно извлекала биогенные элементы при температуре 43°C.

Биоизъятие тяжелых металлов

В настоящее время проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) становится все более актуальной. Клетки МВ способны накапливать в высоких концентрациях многие элементы, включая ТМ, поэтому они широко применяются для очистки стоков от ТМ [57].

Процесс адсорбции ионов металла на поверхности клеток МВ включает связывание его клеточной стенкой и/или цитоплазматической мембраной, а также веществами капсулы и внеклеточных соединений. Эффективность биосорбции металлов клетками МВ напрямую зависит от общей площади клеточной поверхности, поэтому иммобилизация культур на поверхности различных носителей, позволяющая сконцентрировать их в небольшом объеме, в большинстве случаев приводит к значительному увеличению биоизъятия ТМ [58]. В настоящее время для биоизъятия ТМ используют в основном культуры МВ, иммобилизованные на природных носителях (каррагинан, альгинаты, хитозан, агароза) и химических полимерах (полиакриламид, полипропилен, полисульфон, различные сополимеры). В работе [59] для иммобилизации клеток *Tetraselmis chuii* и *Spirulina maxima* использовали морские водоросли *Sargassum* sp. и *Ulva* sp.

Мертвые клетки МВ также весьма эффективно накапливают ионы ТМ. В работе [33] биомасса цианобактерии *Phormidium laminosum*, иммобилизованная на полисульфоне и эпоксидной смоле, используется для концентрирования ионов Cu, Fe,

Ni и Zn. Показано, что количество сорбированного металла увеличивается при увеличении количества биомассы и концентрации ТМ в водных средах. Отмечено, что в течение 10 циклов адсорбции-десорбции эффективность биоизъятия ТМ не снижается. Ионы меди селективно адсорбируются альгинатами [60]. В работе [61] к альгинатному гелю добавляли полистеренсульфонат (NaPSS) для улучшения сорбирующей емкости в отношении меди, однако введение в состав альгинатов клеток цианобактерии *Microcystis* sp. способствовало значительно увеличению количества адсорбированной меди.

В серии работ [17, 62] изучался процесс биоизъятия ионов Ni, Cd, Cr и Pb из водных сред клетками *C. sorokiniana*, иммобилизованными на носителе из люфы. Максимальная адсорбционная емкость в отношении Cd и Ni составляет 192 мг и 71 мг на 1 г иммобилизованной биомассы МВ соответственно. Наибольшее количество свинца адсорбируется при pH 5, и через 5 мин эффективность адсорбции ТМ составляет 96%.

В работе [63] описано использование МВ *Chlamydomonas reinhardtii*, иммобилизованной в альгинатных гранулах, для биоизъятия Hg, Cd и Pb из водных сред. При pH 5,0–6,0 биосорбция Hg, Cd и Pb составила 89,5, 66,5 и 253,3 мг/г сухого веса, соответственно. В работе [64] для биоизъятия урана из образцов соленой и пресной воды использовалась МВ *Chlorella* spp., иммобилизованная в полиакриламидном геле. Показано, что клетки МВ могут быть использованы в нескольких циклах адсорбции после десорбции ионов металла.

Некоторые виды МВ в настоящее время используют для отделения и концентрирования Pd, Pt, Pb, Cu, Cd и Au [31]. В работе [65] показана селективная биосорбция палладия и платины из очень кислых сред (pH < 2) клетками *C. vulgaris*, иммобилизованными на анионообменной смоле Cellex-T.

Таким образом, результаты множества экспериментальных работ, суммированные в данном обзоре, позволяют заключить, что иммобилизованные культуры МВ применимы для промышленного культивирования этих организмов. Иммобилизация упрощает сбор биомассы, способствует повышению устойчивости культур к стрессовым воздействиям и упрощает разработку аппаратного обеспечения для культивирования. Все это в целом приводит к повышению продуктивности культур, а в случае экологических биотехнологий — к росту эффективности очистки сточных вод. Уже сейчас для использования иммобилизованных культур разрабатываются специальные биопленочные фотобиореакторы (ФБР), ориентированные на культивирование МВ с целью получения биомассы и ценных метаболитов, а также для биоремедиации сточных вод. В заключение следует подчеркнуть, что решающее значение для успешного использования иммобилизованных культур МВ в реальных технологиях имеет выбор носителя и способа иммобилизации клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00112).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms // *Ann. Rev. Microbiol.* 1995. Vol. 49. N 1. P. 711–745.
2. Mallick N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review // *Biometals.* 2002. Vol. 15. N 4. P. 377–390.
3. Eroglu E., Smith S.M., Raston C.L. Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses // *Biomass and biofuels from microalgae* / Ed. by N.R. Moheimani, M.P. McHenry, K. de Boer, and P. Bahri. Berlin: Springer, 2015. P. 19–44.
4. Звягинцев Д., Добровольская Т., Лысак Л. Растения как центры формирования бактериальных сообществ // *Ж. общ. биол.* 1993. Т. 54. № 5. P. 183–199.
5. Герасименко Л., Заварзин Г. Реликтовые циано-бактериальные сообщества // *Проблемы доантропогенной эволюции биосферы* / Под ред. А.Ю. Розанова. М.: Наука, 1993. С. 222–253.
6. Сироткин А.С., Шагинурова Г., Инполитов К. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы. Казань: Изд-во ФЭН, 2007. 160 с.
7. Романова Ю., Гинцбург А. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина // *Ж. микробиол., эпидемиол. иммунобиол.* 2011. Т. 3. С. 99–109.
8. Заварзин Г. Эволюция геосферно-биосферной системы // *Природа.* 2003. Т. 1. С. 27–35.
9. Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R. Biofilms: the matrix revisited // *Trends Microbiol.* 2005. Vol. 13. N 1. P. 20–26.
10. Wingender J., Neu T., Flemming H. *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterisation, Structure and Function.* Berlin: Springer, 1999. 123 p.
11. Trench R. Microalgal-invertebrate symbioses—a review // *Endocyt. Cell. Res.* 1993. Vol. 9. N 2–3. P. 135–175.
12. Lopez A., Lazaro N., Marques A.M. The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel-beads // *J. Microbiol. Methods.* 1997. Vol. 30. N 3. P. 231–234.
13. Синуицын А., Райнина Е., Лозинский В., Спасов С. Имобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Издательство МГУ, 1994. 288 с.
14. de-Bashan L.E., Bashan Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects // *Biores. Technol.* 2010. Vol. 101. N 6. P. 1611–1627.
15. Hameed M., Ebrahim O. Biotechnological potential uses of immobilized algae // *J. Agric. Biol.* 2007. N 1. Vol. 9. P. 183–192.
16. Moreno-Garrido I. Microalgae immobilization: current techniques and uses // *Biores. Technol.* 2008. Vol. 99. N 10. P. 3949–3964.
17. Akhtar N., Iqbal J., Iqbal M. Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies // *J. Hazard. Mater.* 2004. Vol. 108. N 1. P. 85–94.
18. Travieso L., Benitez F., Weiland P., Sanchez E., Dupeyron R., Dominguez A. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments // *Biores. Technol.* 1996. Vol. 55. N 3. P. 181–186.
19. Ghosh M., Gaur J. Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities // *Aquat. Bot.* 1998. Vol. 60. N 1. P. 1–10.
20. Nayar S., Goh B., Chou L., Reddy S. In situ microcosms to study the impact of heavy metals resuspended by dredging on periphyton in a tropical estuary // *Aquatic Toxicol.* 2003. Vol. 64. N 3. P. 293–306.
21. Danilov R.A., Ekelund N. Comparison of usefulness of three types of artificial substrata (glass, wood and plastic) when studying settlement patterns of periphyton in lakes of different trophic status // *J. Microbiol. Methods.* 2001. Vol. 45. N 3. P. 167–170.
22. Burdin K., Bird K. Heavy metal accumulation by carrageenan and agar producing algae // *Botanica Marina.* 1994. Vol. 37. N 5. P. 467–470.
23. Khattar J., Sarma T., Singh D. Removal of chromium ions by agar immobilized cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* in a continuous flow bioreactor // *Enz. Microbiol. Technol.* 1999. Vol. 25. N 7. P. 564–568.
24. Schreiter P., Gillor O., Post A., Belkin S., Schmid R., Bachmann T. Monitoring of phosphorus bioavailability in water by an immobilized luminescent cyanobacterial reporter strain // *Biosens. Bioelectron.* 2001. Vol. 16. N 9. P. 811–818.
25. Suzuki T., Yamaguchi T., Ishida M. Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons // *Process Biochem.* 1998. Vol. 33. N 5. P. 541–546.
26. Leino H., Kosourov S.N., Saari L., Sivonen K., Tsygankov A.A., Aro E.-M., Allahverdiyeva Y. Extended H₂ photoproduction by N₂-fixing cyanobacteria immobilized in thin alginate films // *Intern. J. Hydrogen Energy.* 2012. Vol. 37. N 1. P. 151–161.
27. Mallick N., Rai L. Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1994. Vol. 10. N 4. P. 439–443.
28. Lau P., Tam V., Wong Y. Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris* // *Bioresour. Technol.* 1998. Vol. 63. N 2. P. 115–121.
29. Singh Y. Photosynthetic activity, and lipid and hydrocarbon production by alginate-immobilized cells of *Borryococcus* in relation to growth phase // *J. Microbiol. Biotech.* 2003. Vol. 13. N 5. P. 687–691.
30. de-Bashan L.E., Bashan Y., Moreno M., Lebsky V.K., Bustillos J.J. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* // *Canad. J. Microbiol.* 2002. Vol. 48. N 6. P. 514–521.
31. Moreno-Garrido I., Campana O., Lubián L., Blasco J. Calcium alginate immobilized marine microalgae: experiments on growth and short-term heavy metal accumulation // *Mar. Pollut. Bull.* 2005. Vol. 51. N 8. P. 823–829.
32. Joo D., Cho M., Lee J., Park J., Kwak J., Han Y., Buchholz R. New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation // *J. Microencaps.* 2001. Vol. 18. N 5. P. 567–576.
33. Blanco A., Sanz B., Llama M., Serra J. Biosorption of heavy metals to immobilised *Phormidium laminosum* biomass // *J. Biotech.* 1999. Vol. 69. N 2. P. 227–240.

34. Garbisa C., Gil J., Bazin M., Hall D., Serra J. Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors // J. Appl. Phycol. 1991. Vol. 3. N 3. P. 221–234.
35. Aguilar-May B., del Pilar Sánchez-Saavedra M., Lizardi J., Voltolina D. Growth of *Synechococcus* sp. immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH // J. Appl. Phycol. 2007. Vol. 19. N 2. P. 181–183.
36. Banerjee M., Mishra S., Chatterjee J. Scavenging of nickel and chromium toxicity in *Aulosira fertilissima* by immobilization: Effect on nitrogen assimilating enzymes // Electr. J. Biotech. 2004. Vol. 7. N 3. P. 13–14.
37. Thakur A., Kumar H. Use of natural polymers as immobilizing agents and effects on the growth of *Dunaliella salina* and its glycerol production // Acta Biotech. 1999. Vol. 19. N 1. P. 37–44.
38. Lebeau T., Moan R., Turpin V., Robert J. Alginate-entrapped *Haslea ostrearia* as inoculum for the greening of oysters // Biotech. Tech. 1998. Vol. 12. N 11. P. 847–850.
39. Cassidy M., Lee H., Trevors J. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review // J. Industr. Microbiol. 1996. Vol. 16. N 2. P. 79–101.
40. Jeanfils J., Collard F. Effect of immobilizing *Scenedesmus obliquus* cells in a matrix on oxygen evolution and fluorescence properties // Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech. 1983. Vol. 17. N 4. P. 254–257.
41. Robinson P., Goulding K., Mak A., Trevan M. Factors affecting the growth characteristics of alginate-entrapped *Chlorella* // Enz. Microbiol. Technol. 1986. Vol. 8. N 12. P. 729–733.
42. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions // Mar. Drugs. 2011. Vol. 9. N 6. P. 1101–1118.
43. Gudin C., Thepenier C. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae // Advan. Biotech. Proces. 1986. Vol. 6. P. 73–110.
44. Matsunaga T., Sudo H., Takemasa H., Wachi Y., Nakamura N. Sulfated extracellular polysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia* immobilized on light-diffusing optical fibers // Appl. Microbiol. Biotech. 1996. Vol. 45. N 1–2. P. 24–27.
45. Rao K., Hall D. Photosynthetic production of fuels and chemicals in immobilized systems // Trends Biotech. 1984. Vol. 2. N 5. P. 124–129.
46. Kannaiyan S., Rao K., Hall D. Immobilization of *Anabaena azollae* from *Azolla filiculoides* in polyvinyl foam for ammonia production in a photobioreactor system // World J. Microb. Biot. 1994. Vol. 10. N 1. P. 55–58.
47. Melis A., Zhang L., Forestier M., Ghirardi M., Seibert M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. 2000. Vol. 122. N 1. P. 127–136.
48. Kosourov S., Seibert M. Hydrogen photoproduction by nutrient deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions // Biotech. Bioeng. 2009. Vol. 102. N 1. P. 50–58.
49. Laurinavichene T., Kosourov S., Ghirardi M., Seibert M., Tsygankov A. Prolongation of H₂ photoproduction by immobilized, sulfur-limited *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // J. Biotechnol. 2008. Vol. 134. N 3. P. 275–277.
50. Kayano H., Karube I., Matsunaga T., Suzuki S., Nakayama O. A photochemical fuel cell system using *Anabaena* N-7363 // Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech. 1981. Vol. 12. N 1. P. 1–5.
51. Solovchenko A., Lukyanov A., Vasilieva S., Savanina Y., Solovchenko O., Lobakova E. Possibilities of bioconversion of agricultural waste with the use of microalgae // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 4. P. 206–215.
52. Abe K., Takahashi E., Hirano M. Development of laboratory-scale photobioreactor for water purification by use of a biofilter composed of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* (Chlorophyta) // J. Appl. Phycol. 2008. Vol. 20. N 3. P. 283–288.
53. Travieso L., Benitez F., Dupeiron R. Sewage treatment using immobilized microalgae // Biores. Technol. 1992. Vol. 40. N 2. P. 183–187.
54. de la Noüe J., Proulx D. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium* // Appl. Microbiol. Biotech. 1988. Vol. 29. N 2–3. P. 292–297.
55. Garbayo I., Vigarra A., Conchon V., Dos Santos V., Vilchez C. Nitrate consumption alterations induced by alginate-entrapped of *Chlamydomonas reinhardtii* cells // Process Biochem. 2000. Vol. 36. N 5. P. 459–466.
56. Sawayama S., Rao K., Hall D. Nitrate and phosphate ion removal from water by *Phormidium laminosum* immobilized on hollow fibres in a photobioreactor // Appl. Microbiol. Biotech. 1998. Vol. 49. N 4. P. 463–468.
57. Nascimento C., Xing B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation // Scientia agricola. 2006. Vol. 63. N 3. P. 299–311.
58. Malik A. Metal bioremediation through growing cells // Environ. Int. 2004. Vol. 30. N 2. P. 261–278.
59. Da Costa A.C.A., De França F.P. Cadmium uptake by biosorbent seaweeds: adsorption isotherms and some process conditions // Separat. Science Technol. 1996. Vol. 31. N 17. P. 2373–2393.
60. Alhakawati M., Banks C. Removal of copper from aqueous solution by *Ascophyllum nodosum* immobilised in hydrophilic polyurethane foam // J. Environ. Manag. 2004. Vol. 72. N 4. P. 195–204.
61. Jang L., Nguyen D., Geesey G. Selectivity of alginate gel for Cu over Zn when acidic conditions prevail // Water Res. 1999. Vol. 33. N 12. P. 2817–2825.
62. Akhtar N., Iqbal M., Zafar S., Iqbal J. Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr (III) // J. Environ. Sci. 2008. Vol. 20. N 2. P. 231–239.
63. Bayramoglu G., Tuzun I., Celik G., Yilmaz M., Arica M. Biosorption of mercury (II), cadmium (II) and lead (II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads // Int. J. Mineral Process. 2006. Vol. 81. N 1. P. 35–43.
64. Nakajima A., Horikoshi T., Sakaguchi T. Recovery of uranium by immobilized microorganisms // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech. 1982. Vol. 16. N 2–3. P. 88–91.
65. Dziwulska U., Bajguz A., Godlewska-Zylkiewicz B. The use of algae *Chlorella vulgaris* immobilized on cellex-T support for separation/preconcentration of trace amounts of platinum and palladium before GFAAS determination // Anal. Letters. 2004. Vol. 37. N 10. P. 2189–2203.

ECOLOGY

IMMOBILIZED MICROALGAE IN BIOTECHNOLOGY

*S.G. Vasilieva**, *E.S. Lobakova*, *A.A. Lukyanov*, *A.E. Solovchenko*

Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University; Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

** e-mail: vankat2009@mail.ru*

Here we present a brief review of current data on immobilization of oxygenic phototrophic microorganisms — cyanobacteria and eukaryotic microalgae — in natural and artificial experimental systems. We emphasize that immobilization, e.g. in biofilms, is a basic, widespread in nature strategy ensuring the survival of microorganisms. Accordingly, the artificially immobilized microalgal cells might be considered as a special group of biomimetic (bioinspired) materials. Special attention is paid to the effect(s) of different immobilization methods on the physiology of microalgal cells and their stress tolerance as well as productivity of microalgal cultures. A comparison of the advantages and drawbacks of different immobilization techniques and cell carriers is presented. The review concludes with outlook on the possibilities of using of the immobilized phototrophic cells in biotechnology. Specific areas include (but not limited to) the biomass and metabolites production and harvesting, removal of heavy metals, biocapture of nutrients from wastewater and destroying of organic pollutants are explored.

Key words: *immobilization, microalgae, cyanobacteria, biotechnology, biofilms, review*

Сведения об авторах:

Васильева Светлана Геннадьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: vankat2009@mail.ru

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф., зам. зав. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

Лукьянов Александр Андреевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: loockart@mail.ru

Соловченко Алексей Евгеньевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru