

Краткая аннотация работы

Название работы: Инкапсуляция живых клеток микроорганизмов в биоимитирующие оболочки карбоната кальция.

С развитием нанотехнологий в мире и в нашей стране большое внимание стали уделять созданию новых материалов для различных областей применений. Ученые различных областей науки устремили свой взор на природу не только как на источник ресурсов, но и как вдохновителя к созданию новых перспективных материалов. В последние годы все больше и больше становится популярным такое направление в науке как биомиметика. Биомиметика – это подход к созданию технологических устройств и новых материалов, при котором идеи и основные элементы устройства заимствуются из живой природы.

Создание новых биосовместимых материалов является важной задачей для исследователей-биологов. Исследования процессов формирования биогенного карбоната кальция позволяет создавать новые биосовместимые материалы, совмещающие в себе свойства органических и неорганических веществ, а также приблизиться к открытию эволюционных механизмов формирования биогенных минералов.

В связи с этим целью нашей работы явилось создание нового класса биокolloидных микрочастиц – биоимитирующих оболочек карбоната кальция, инкапсулирующих живые клетки микромицетов (*Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma asperellum*) и водорослей (*Dunaliella martima*).

Для достижения цели были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. осуществление синтеза биокolloидных микрочастиц.
2. определение оптимальных условий процесса инкапсуляции живых клеток.
3. характеристика полученных структур с помощью микроскопических методов.
4. определение жизнеспособности инкапсулированных клеток.

Основные результаты работы:

1. В результате нашей работы был получен новый класс гибридных биосовместимых микрокапсул, содержащих живые клетки в качестве матрицы.
2. Было показано, что инкапсулированные клетки остаются живыми.
3. Было показано, что в качестве кора для создания микрокапсул могут быть использованы как клетки микроорганизмов, так и клетки водорослей.
4. Полученные структуры были охарактеризованы микроскопическими методами.
5. Было показано, что pH влияет на форму капсул, степень и характер их агрегированности и выход продукта реакции.

Представленная на конкурс работа легла в основу статьи: R. F. Fakhrullin and R. T. Minullina. Hybrid cellular–inorganic core–shell microparticles: encapsulation of individual living cells in calcium carbonate microshells // *Langmuir* – 2009. – Vol. 25, № 12. – P. 6617–6621.

Сведения об авторе работы

ФИО автора	Минуллина Рената Тавкилевна
ВУЗ	Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина Биолого – почвенный Кафедра биохимии
Курс	3 курс
Премии и награды	<ol style="list-style-type: none">1. Диплом 3 степени победителя конкурса презентаций проектов в рамках Всероссийской школы-семинара «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы» (г. Белгород 2008 год).2. Диплом за 2 место в Конкурсе на лучшую научную работу студентов КГУ 2009 года3. Победитель программы «Участник Молодежного Научно-Инновационного Конкурса» («УМНИК»)
Научный руководитель	Фахруллин Равиль Фаридович, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биохимии КГУ

Отзыв научного руководителя

Минуллина Рената Тавкилевна поступила на кафедру биохимии Казанского государственного университета в 2006 году. В настоящее время является студенткой 3-го курса и успешно обучается по специальности биохимия, специализации – молекулярная фармакология.

Со 2-го курса Рената занимается научной работой в лаборатории биоматериалов и наноматериалов кафедры биохимии КГУ. Рената является добросовестным и вдумчивым экспериментатором, скрупулезно и требовательно оценивающим полученные результаты. Рената с удовольствием занимается научно-исследовательской работой. Для нее характерно не механическое выполнение непосредственно поставленных перед ней задач, а импровизация, творческий подход к научной работе. Для Ренаты также свойственно не характерное для большинства студентов младших курсов понимание и осознание того, что они делают в лаборатории. Область научных интересов Ренаты – изучение взаимодействия живых объектов с наноматериалами и создание новых биосовместимых материалов.

Рената стремится к познанию нового, неизученного, неисследованного. Так как Рената владеет английским языком, то основным источником информации для нее являются оригинальные статьи в ведущих международных журналах и современные учебники, изданные за рубежом. Научный кругозор Ренаты весьма широк, что не мешает ей постоянно его совершенствовать.

Рената принимала участие во всероссийских и международных конференциях таких как: «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 15 – 16 сентября 2008 г) и всероссийская школа-семинар «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы» (Белгород, 9 – 11 декабря 2008 г), международный симпозиум студентов-биологов «SimBioSE» (Казань, 31 июля – 8 августа 2009 г). Хочется особо отметить тот факт, что на конференции в Белгороде Рената выступала с устным докладом и стала победителем конкурса инновационных проектов.

В 2008-2009 учебном году она стала обладательницей диплома 2-й степени конкурса «Лучшая научно-исследовательская работа студентов КГУ». Рената является соавтором 4 публикаций.

В связи с вышесказанным я считаю, что данная работа может быть подана на конкурс.

Фахруллин Р.Ф.

к. б. н., старший преподаватель кафедры биохимии КГУ

Реферат работы

ВВЕДЕНИЕ

Создание новых биосовместимых материалов является на сегодняшний день важной задачей для исследователей. Исследования в этой области ведутся уже около двадцати лет, но масштабность приобрели только в последнее десятилетие. Одним из бурно развивающихся направлений является изучение биологических и кристаллографических механизмов биоминерализации с целью создания новых продуктов от керамики до катализаторов. Стоит отметить, что с появлением этого направления внимание ученых обратилось на самый распространенный на планете минерал биологического происхождения – карбонат кальция. В природе карбонат кальция входит в состав раковин и костей, перламутрового слоя раковин моллюсков, в том числе и жемчуга; в эндоскелет кораллов. Таким образом, он обладает прекрасными протектерными свойствами, что может быть использовано при создании микрореакторов и минерализованных микрокапсул, а также инкапсуляции клеток.

Частицы карбоната кальция существуют в различных полиморфных модификациях, которые различаются не только по строению кристаллической решетки, но и форме частиц. Аморфный карбонат кальция имеет шарообразную форму, арагонит – игольчатую, кальцит – кубическую. В связи с этим частицы карбоната кальция так же используется в качестве удобного темплата для создания полых полиэлектролитных микрокапсул.

Пористая структура – еще одно полезное свойство карбоната кальция. Следовательно, его можно использовать как перспективный адсорбент различных веществ, в том числе и макромолекул.

Стоит также упомянуть о сравнительно новом направлении в биологической науке биомиметике. Биомиметика – это использование биологических объектов в качестве матриц и прототипов для создания различных материалов и искусственных биологических систем (например, цитозом (Fakhrullin and Paunov, 2009)). Научные исследования в области биомиметики позволили исследователям более детально изучать такой процесс, как биоминерализация.

В соответствии с вышеизложенным, целью нашей работы явилось создание нового класса биокolloидных микрочастиц – биоимитирующих оболочек карбоната кальция, инкапсулирующих живые клетки микромицетов (*Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma asperellum*) и водорослей (*Dunaliella maritima*).

В связи с поставленной целью были поставлены следующие задачи:

1. осуществление синтеза биокolloидных микрочастиц.
2. определение оптимальных условий процесса инкапсуляции живых клеток.
3. характеристика полученных структур с помощью микроскопических методов.
4. определение жизнеспособности инкапсулированных клеток.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Синтез карбоната кальция *in vitro*

Ранее уже отмечалось, что карбонат кальция в природе существует в различных полиморфных модификациях. На сегодняшний день ученые научились синтезировать карбонат кальция всех известных полиморфных модификаций как кристаллический, так и аморфный.

Двухструйный метод (double-jet method): на рисунке 2 изображена экспериментальная установка для синтеза карбоната кальция данным методом (Naka, 2007). В круглодонную колбу, помещенную на водяную баню, одновременно через капилляры подаются растворы $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ и CaCl_2

Метод диффузии: Экспериментальная установка состоит из герметичной камеры, внутрь которой помещены сосуды с водным раствором хлорида кальция (Рис. 1). На дне камеры помещают карбонат аммония – источник CO_3^{2-} . Камеру помещают на водяную баню, в результате подогрева, выделяется углекислый газ, который диффундирует в сосуды с раствором CaCl_2 . Данный метод часто используют для кристаллизации на поверхности самособирающихся слоев алкилтиолов на золоте (Küther et al., 1999).

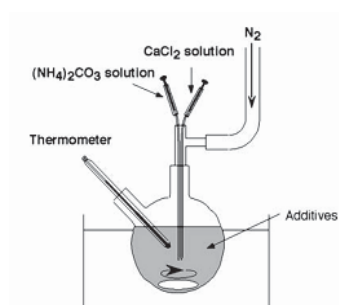


Рис. 1 Экспериментальная установка для синтеза CaCO_3 двухструйным методом.

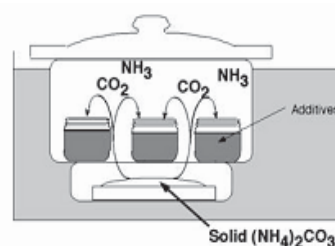


Рис.2 Экспериментальная установка для синтеза CaCO_3 методом диффузии.

Hirai с соавторами предложил биоимитирующий метод синтеза карбоната кальция (Hirai et al., 1997). Равные объемы внутренней водной фазы эмульсии (водные растворы 0.1моль/л Na_2CO_3 , 0-0.2моль/л NaOH , 0-0.18 моль/л NaNO_3 , pH в пределах от 11 до 13.3) и

органической мембранной фазы, содержащей керосин с 0.05 моль/л D2ЕНРА и 6% Span 83 смешали и механически гомогенизировали. В результате была получена простая эмульсия. Затем 25 мл этой эмульсии смешали с 50 мл 0.01 моль/л CaNO_3 и перемешивали в течение 1,5 ч. Ранее было показано, что D2ЕНРА является слабым экстрактантом для щелочно-земельных металлов (Сох, 1983) При деэмульсификации методом замораживания-размораживания (freeze-thaw demulsification method) полученные ватеритные частицы со средним диаметром 60 нм переходили в форму полых раковин с диаметром 1-1,5 мкм.

Позднее Qi и Zhu предложили синтез ватеритных частиц различной формы и размеров в системе вода-этиленгликоль-ПАВ (Qi and Zhu, 2006). Синтез проводили при комнатной температуре. Сначала приготовили 2 реакционные смеси, содержащие ПАВ (SDS или СТАВ), источник ионов (Ca^{2+} или CO_3^{3-}) и этиленгликоль. В качестве донора Ca^{2+} ионов был использован ацетат кальция, а анионов CO_3^{3-} - Na_2CO_3 . Затем при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке смешивали реакционные смеси (таблица 1). После помутнения смеси ее нагревали в микроволновой печи при 100°C . Затем промывали водой, центрифугировали и сушили при 60°C на воздухе.

В зависимости от используемого ПАВ и его концентрации, а так же от времени нагревания получались частицы различной формы (таблица 1).

Watanabe с сотрудниками показали, что в качестве матрицы для агрегации частиц карбоната кальция могут служить пузырьки углекислого газа, пропускаемые через раствор CaCl_2 . Этот метод достаточно прост и выход продукта реакции велик. В связи с этим авторы полагают, что предложенный ими метод можно осуществлять в промышленных масштабах (Watanabe et al., 2009). Экспериментальная установка для данного метода показана на рисунке 3. Раствор CaCl_2 помещали в стеклянный реактор, который стоит на водяной бане с магнитной мешалкой. CO_2 вводился из газового баллона. pH и температура раствора измерялись pH-метром (pH/termo-meter) и автоматически записывались. Помимо этого в установку входила оптическая проточная ячейка (optical flow-cell), при помощи которой измеряли пропускание ИК-излучения (850 нм) для измерения концентрации частиц. После прохождения через нее раствор возвращается обратно в реактор.

Rautaray с соавторами показала один из возможных механизмов синтеза биогенного карбоната кальция, используя грибы и актиномицеты (Rautaray et al., 2003; Rautaray et al., 2004). Авторы использовали два микроорганизма, а именно: эндофитный гриб рода *Verticillium* и актиномицет рода *Thermomonospora*.

Морфология частиц карбоната кальция при различных условиях синтеза

Состав реакционных смесей	Время нагревания в микроволновой печи, мин.	Морфология частиц
SDS (1.5ммоль) / этиленгликоль (10мл) / 0.75моль/л Ca(CH ₃ COO) ₂ водный (2мл) + SDS (1.5ммоль) / этиленгликоль (10мл) / 0.75моль/л Na ₂ CO ₃ водный (2мл)	8	мечевидные
SDS (1.5ммоль) / этиленгликоль (10мл) / 0.75моль/л Ca(CH ₃ COO) ₂ водный (2мл) + SDS (1.5ммоль) / этиленгликоль (10мл) / 0.75моль/л Na ₂ CO ₃ водный (2мл)	5	биконические
СТАВ (1.5ммоль) / этиленгликоль (10мл) / 0.75моль/л Ca(CH ₃ COO) ₂ водный (2мл) + СТАВ (1.5ммоль) / этиленгликоль (10мл) / 0.75моль/л Na ₂ CO ₃ водный (2мл)	10	сферические
SDS(3ммоль) / этиленгликоль (10мл) / 0.75моль/л Ca(CH ₃ COO) ₂ водный (2мл) + SDS (3ммоль) / этиленгликоль (10мл) / 0.75моль/л Na ₂ CO ₃ водный (2мл)	10	Смесь мечевидных и кубических

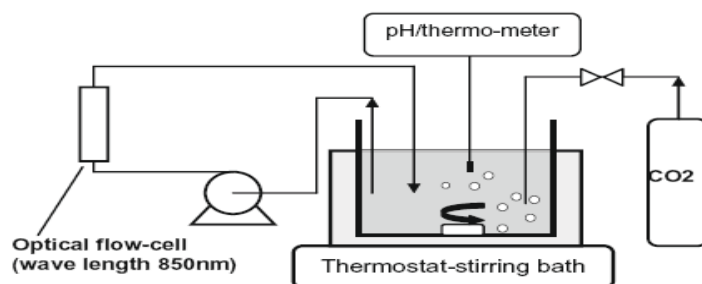


Рис. 3 Экспериментальная установка для синтеза CaCO₃ частиц при on-line мониторинге пропускания ИК-излучения (Watanabe et al., 2009).

Авторы использовали два микроорганизма, а именно: эндофитный гриб рода *Verticillium* и актиномицет рода *Thermomonospora*. Далее работали с мицелием микроорганизмов, полученным после культивирования. 20 г сухого веса мицелия ресуспендировали в водном растворе CaCl₂ и поместили в термостат при 27°C на 72 часа при постоянном перемешивании (200 об/мин). Через несколько суток суспензия приобретала мутный белый цвет. С помощью методов Фурье-спектроскопии и рентгенографии авторы показали, что полученная взвесь представляет собой частицы различных полиморфных модификаций карбоната кальция. По характерным пикам в спектрах авторы так же определили, что в состав карбонатных микрочастиц входят белки.

Позднее Chen с соавторами показали, что биологическую трансформацию кальция могут осуществлять и некоторые бактерии (Chen et al., 2009). В данной работе культуру бактерий *Proteus mirabilis* инкубировалась 5 дней в смеси мочевины (0.2 моль/л) и хлорида кальция (0.1 моль/л). Этот микроорганизм способен продуцировать экстрацеллюлярный фермент, который разрушает мочевины до аммиака и углекислого газа. В результате чего образовывались полые ватеритные частицы карбоната кальция. Авторы полагают, что фермент в данном случае является центром кристаллизации для карбоната кальция.

Liang с соавторами предположили, что матрицей для биоминерализации может служить природный полисахарид хитин. В зависимости от концентрации хитина в растворе получали агрегаты карбоната кальция различной формы, в том числе и в форме цветка петунии (Liang et al., 2004). Одиночные частицы карбоната кальция различной морфологии были получены группой Xiang. В данной работе авторы использовали метод диффузии для синтеза частиц, а в качестве матрицы – крахмал (Xiang et al., 2008).

Стоит отметить, что во всех описанных выше работах, клетки микроорганизмов являются продуцентами каких-либо веществ, которые индуцируют нуклеацию частиц карбоната кальция, но не обволакивают клетки.

1.2 Влияние pH на формирование частиц карбоната кальция

Сравнительно недавно стали изучать влияние различных факторов на процесс формирования частиц карбоната кальция. pH среды значительно влияет на поведение и физико-химические свойства многих биологических молекул.

Для твердых частиц и поверхностей важным показателем является зета-потенциал. Зета-потенциал – это электрический потенциал между краями диффузного слоя ионов в жидкости, окружающей заряженную коллоидную частицу или поверхность макроскопического твердого тела.

Было показано, что при различных значениях pH меняется зета-потенциал поверхности CaCO_3 частиц. Так при pH = 7-8 зета потенциал положительный, а при pH=9-10 – отрицательный (Volodkin et al., 2004).

Поверхностный заряд твердого материала влияет на его взаимодействие с окружением, что делает это свойство решающим для многих сфер применения в технических областях и медико-биологических науках. Поэтому сведения о поверхностном заряде имеют первостепенную важность при учете оказываемого влияния на свойства поверхности твердого тела.

Watanabe с соавторами для изучения влияния pH на процесс формирования полых микрокапсул использовали 0.1 М раствор хлорида кальция с начальным уровнем pH=9.4-10.3

с шагом 0.15 единиц. pH довели до необходимого уровня с помощью растворов HCl и NH₄OH. С помощью метода сканирующей электронной микроскопии авторы показали, что при высоком уровне pH (10-10.3) образуются частицы с отверстием в центре (рис. 4), при более низких значениях начального pH (9.4-9.85) формируются замкнутые полые капсулы (рис. 5).

Рентгеноструктурный анализ показал, что все полученные капсулы являются ватеритными, из чего можно заключить, что уровень pH не влияет на кристаллическую структуру капсул, а влияет только на их морфологию.

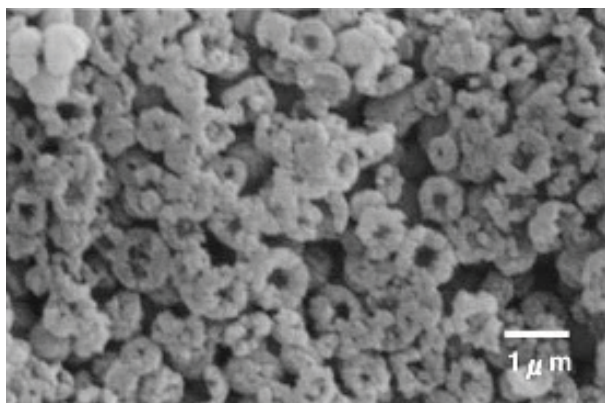


Рис. 4 СЭМ изображение микрокапсул CaCO₃, полученных при pH=10 (Watanabe et al., 2009).

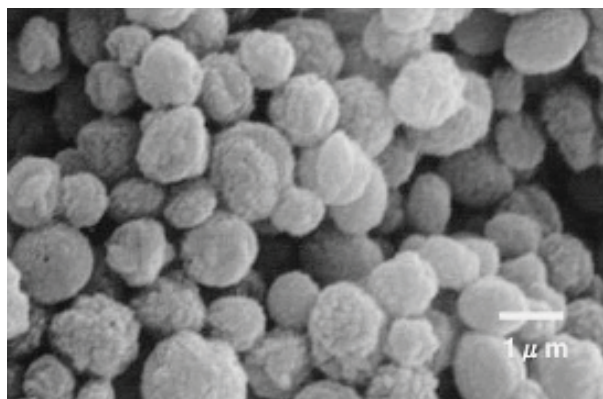


Рис. 5 СЭМ изображение микрокапсул CaCO₃, полученных при pH=9.3 (Watanabe et al., 2009).

1.3 Практическое применение микрокапсул карбоната кальция в медицине и биологии.

Как уже отмечалось выше, частицы CaCO₃ широко используются в качестве формы для создания различных полых капсул.

Так Ming-Yan Ma с соавторами получили полые капсулы гидроксиапатита (ГАП) и CaSiO₃ (Ma et. al., 2008), которые предполагают в дальнейшем использовать для доставки лекарств. Сначала они синтезировали CaCO₃ кор путем реакции ацетата кальция Ca(CH₃COO)₂ с гидрокарбонатом натрия NaHCO₃ в смеси воды и этиленгликоля при комнатной температуре. Этилен-гликоль добавляли для того чтобы предотвратить перекристаллизацию ватерита в кальцит (Qi and Zhu, 2006) Далее полученные частицы карбоната обрабатывались раствором, содержащим либо ионы PO₄³⁻, либо SiO₃²⁻, что приводило к образованию оболочек из ГАП или силиката соответственно. В случае ГАП капсул карбонат удалялся при воздействии разбавленной уксусной кислоты, а в случае капсул из силиката проводилась термообработка при 900°C, вследствие чего карбонат разлагался. В результате получались полые оболочки из ГАП или силиката кальция. Далее

капсулы нагружали типичным противовоспалительным препаратом ибупрофеном, который медленно высвобождался из капсул при помещении их в SBF (simulated body fluid). На основании полученных результатов авторы предположили, что такие структуры могут быть использованы для доставки лекарств.

Высокая пористость и большая площадь поверхности частиц карбоната кальция также представляют огромный интерес для их практического применения.

Было показано, что инкапсуляция таких биологических макромолекул, как белки и углеводы, в полиэлектролитные микрокапсулы, возможна при использовании частиц карбоната кальция в качестве сорбента (Volodkin et al., 2004). В данной работе использовали несколько различных белков и полисахаридов, отличающихся по молекулярной массе и, соответственно, по размеру молекул. Средний диаметр пор частиц карбоната кальция составлял 35 нм. При помощи метода флуоресцентной микроскопии авторы показали, что низкомолекулярные белки и полисахариды более эффективно проникают в поры, чем высокомолекулярные.

Далее частицы, содержащие белки или полисахариды покрывали несколькими слоями PAA/PSS и растворяли ядро карбоната кальция. При этом было отмечено, что макромолекулы в большинстве своем не теряли своих изначальных свойств.

1.4 Инкапсуляция живых клеток

Широкое распространение в последние годы получили исследования в области создания биосовместимых материалов с целью создания систем адресной доставки лекарств и имплантатов.

Для этого часто используют как биологические, так и синтетические полимеры.

Так Green с соавторами предложили способ инкапсуляции клеток костного мозга человека в хитозан-альгинатные микрокапсулы, покрытые фосфатом кальция (Green et al., 2006). Хитозан – это водорастворимый катионный полисахарид, который образуется при деацетилировании хитина. Хитозан широко используют в качестве остова для эпидермальной и хрящевой ткани. Альгинатные гели образуют благоприятную среду для роста и дифференциации хондриоцитов. Авторы полагают, что эти системы могут быть в дальнейшем использованы в тканевой инженерии для восстановления скелетной ткани.

В работе Diaspro с соавторами был предложен метод инкапсуляции клеток микроорганизмов в полиэлектролитные капсулы, используя метод послойного нанесения противоположно заряженных полиэлектролитов PAA и PSS (Diaspro et al., 2002). Было показано, что после инкапсуляции клетки сохраняют метаболическую активность и

способность к делению. Авторы предположили, что благодаря разнообразным свойствам многослойной пленки, клетки, модифицированные такими пленками, могут широко использоваться в биофизических и биотехнологических приложениях в качестве дешевой модельной системы.

Клетки так же могут быть использованы для создания различных полых капсул, которые обладают рядом полезных свойств. Так, например, Donath с соавторами покрывали эритроциты человека PAM/PSS. Затем покрытые клетки депротеинизировали 1.2 % раствором NaOCl в течение 20 мин. Далее промывали NaCl 3 раза. Таким образом, были получены полые ПЭ капсулы. Внутреннее содержимое вымылось посредством диффузии после химической деградации. Авторы предполагают, что после депротеинизации капсулы становятся более пористые. ПЭ капсулы непроницаемы для водорастворимых полимеров с молекулярным весом 4000 и выше, но проницаемы для низкомолекулярных компонентов (ионов, ПАВ). Так же было показано, что покрытие капсул липидами предотвращает проникновение полярных молекул внутрь капсулы.

Таким образом, использование клеток в качестве матриц открывает широкие возможности для создания новых биосовместимых материалов, которые могут быть использованы в различных практических применениях.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Реактивы и оборудование

2.1.1 Реактивы

- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Экрос)
- Na_2CO_3 (Реахим)
- NaCl (Экрос)
- NH_4Cl (Реахим)
- KH_2PO_4 (Экрос)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (Реахим)
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Экрос)
- HCl 30% раствор
- NaOH (Экрос)
- глицин (Serva)
- трис (оксиметил)-аминометан гидрохлорид (Реахим)
- глюкоза 40% раствор
- бидистиллированная вода
- родамин (Sigma)
- флуорисцеин диацетат (Fluka)

2.1.2 Оборудование

- Магнитная мешалка (PoLamed)
- Дозаторы (Ленпипет и Eppendorf)
- Центрифуга (Mini spin Plus, Eppendorf)
- Ультразвуковая баня (Branson B-120 E1)
- Фотоэлектроколориметр (Zalimp KF 77)
- pH-метр (Metter Toledo Five Easy)
- Шейкер (Bio Vortex V1)
- Сканирующий электронный микроскоп (Carl Zeiss Evo-40)
- Просвечивающий электронный микроскоп (Jeol 1200 EX)
- Оптический микроскоп (Carl Zeiss Jenamed)
- Оптический микроскоп (Olympus BX 51)
- Поляризационный микроскоп (Worzava)
- Цифровая видеокамера Webbers MYscope 300 M
- Ультрамикротом Ultracut III (LKB, Sweden)

2.2.3 Объекты исследования и их подготовка

В качестве биологической матрицы для создания полых микрокапсул из карбоната кальция мы использовали клетки пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (коммерческий препарат), конидии *Trichoderma asperellum* и клетки одноклеточной зеленой водоросли *Dunaliella martima*.

Грибы рода *Trichoderma* и *Saccharomyces* представляют большой интерес в области биотехнологии, целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности. Дрожжи широко используются в научных исследованиях в качестве модельных организмов для генетических исследований и в молекулярной биологии (Тулякова с соавт., 2004; Инге-Вечтомов, 2000).

Виды *Trichoderma* являются продуцентами многих ферментов (целлюлаз, пектиназ, хетиназ, серинзависимых протеиназ и др.) (Franco et al., 2004), которые используются в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности (Kubicek et al., 1998). Используемые изоляты *T. asperellum* были выделены из почвы Республики Татарстан. Конидии были взяты из коллекции кафедры биохимии. Для получения конидий микромицеты культивировали на натуральной среде (картофельно-глюкозный агар) в течение 5 суток при температуре 28С°.

Таблица 2

Состав картофельно-глюкозного агара (г/л)

Картофель	200
Глюкоза	20
Агар	18

Одноклеточная водоросль *Dunaliella martima* использовалась нами для доказательства того, что процесс инкапсуляции в биоимитирующие сферы карбоната кальция действительно имеет место. Она имеет жгутик и быстро передвигается в жидкой среде. При заключении подвижной клетки в твердую капсулу из карбоната кальция движения в среде не должно наблюдаться. Водоросли были предоставлены к. б. н. Н. В. Петровой. Для поддержания жизнедеятельности водоросли культивировали в жидкой среде, состав которой описан в статье Каримовой Ф.Г. (Karimova et al., 2000).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Инкапсуляция клеток в CaCO₃ микросферы

Инкапсуляция клеток дрожжей. В эквимоллярные растворы солей CaCl₂ и Na₂CO₃ добавляли суспензию клеток дрожжей в бидистиллированной воде (bd H₂O) в соотношении 10:1. Предварительно дрожжи промывали 3 раза bd H₂O (взбивали на Vortex и центрифугировали при 3000 об\мин, надосадок сливали). Оптическая плотность суспензии

составляла 0,6 ед. при 480 нм (красный светофильтр). При постоянном перемешивании на магнитной мешалке смешивали растворы солей. Сразу же образовывалась белая взвесь CaCO_3 . Перемешивали в течение 5 минут. Осаждали. Промывали 3 раза H_2O от образовавшегося NaCl . Затем осадок фильтровали с помощью водоструйного насоса и сушили при комнатной температуре в течение суток.

Инкапсуляция клеток Trichoderma asperellum. Готовили суспензию клеток таким же образом, как для дрожжей. Оптическая плотность – 0,19 при 480 нм (красный светофильтр). Инкапсулировали так же, как описано выше.

Инкапсуляция клеток Dunaliella martima. 1 мл суспензии водорослей промывали от компонентов питательной среды 3 раза, как описано выше. Затем ресуспендированные в воде водоросли добавляли по 0.5 мл в растворы Na_2CO_3 и CaCl_2 .

2.3.2 Изучение влияния pH на форму капсул и процесс инкапсуляции

Сначала мы готовили растворы Na_2CO_3 и CaCl_2 на глицин- HCl (pH=2.01), глицин- NaOH (pH=10.66) буферах (по 5 мл каждый). Затем в раствор CaCl_2 добавляли по 1 мл суспензии дрожжей оптической плотностью 0.62 при 480 нм (красный светофильтр) в стеклянных кюветах шириной 1 см. Инкубировали 20 минут. Далее смешивали соли, как описано выше. Результаты визуализировали с помощью микроскопических методов.

2.2.3 Культивирование конидий Trichoderma asperellum

Известно, что при определенных условиях конидии *T. asperellum* способны прорасти (образовывать мицелий).

Для создания таких условий мы культивировали инкапсулированные (опыт) и неинкапсулированные (контроль) в жидкой питательной среде для несовершенных грибов состава: 21 мМ Na_2HPO_4 , 11 мМ KH_2PO_4 , 9.3 мМ NH_4Cl , 4.3 мМ NaCl , 0.014 мМ CaCl_2 , 0.5 мМ MgSO_4 , 0.01 % глюкоза (Li et al., 2003). Доводили pH до 7. 3 мл суспензии инкапсулированных клеток помещали в 10 мл питательной среды. В качестве контроля – неинкапсулированные конидии. Образцы помещали в термостат при 28° С на 18 часов.

2.3.4 Визуализация результатов с помощью микроскопии

2.3.4.1 Световая микроскопия

Образцы инкапсулированных клеток визуализировали с помощью метода световой микроскопии. Для этого 10-20 мкл суспензии клеток помещали на предметное стекло,

покрывали покровным стеклом. Далее получали изображение при помощи цифровой видеокамеры Webbers MYscore 300 M и программного обеспечения Score Photo. При работе использовались объективы с увеличением x40 и x100. При увеличении x100 работали в иммерсионной системе. Дальнейшая обработка изображений (проставление шкал размера и внесение текстовой информации) производилась с помощью программы Adobe Photoshop.

2.3.4.2 Поляризационная микроскопия

Поляризационный микроскоп является модификацией светового микроскопа, в котором установлены два поляризационных фильтра — первый (поляризатор) между пучком света, и объектом, а второй (анализатор) между линзой объектива и глазом. Через первый фильтр свет проходит только в одном направлении, второй фильтр имеет главную ось, которая располагается перпендикулярно первому фильтру, и он не пропускает свет. Получается эффект темного поля. Кристаллы, благодаря явлению двойного лучепреломления проявляются в виде светящихся пятен на темном поле.

2.3.4.3 Электронная сканирующая микроскопия

Для получения изображений с высоким разрешением использовался сканирующий электронный микроскоп Carl Zeiss Evo-40. Были получены типичные изображения объектов при увеличении 20000-25000 раз.

Подготовка образцов:

1-3 мкл суспензии клеток наносили на обезжиренную поверхность покровного стекла и высушивали в термостате при 50°C в течение часа. Затем покровные стекла помещали в прибор для напыления (Bal-tec Sputter coater) и напыляли тонкий слой золота на поверхность стекол.

2.3.4.4 Электронная просвечивающая микроскопия

С помощью просвечивающей электронной микроскопии были получены типичные изображения клеток и микрокапсул с высоким разрешением.

Подготовка образцов:

Первоначально клетки фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом и 1.5% параформальдегидом в фосфатном буфере (0.1M, pH 7.4) в течение 2 часов при комнатной температуре, а затем обрабатывали 1% OsO₄ в течение часа. После дегидратации образцы

помещали в смолу Epon (PELCO Eponate 12 Kit, Prod. No. 18010). Затем с помощью ультрамикротомы получали ультратонкие срезы и устанавливали их на медную решетку, покрытую формваром. После этого срезы окрашивали 2% водным раствором ацетата урана и цитрата свинца при комнатной температуре.

2.3.5 Оценка жизнеспособности инкапсулированных клеток

Жизнеспособность клеток оценивалась с помощью метода флуоресцентной микроскопии. Микросферы, содержащие внутри клетки, окрашивали FDA следующим образом: готовили сток-раствор FDA в ацетоне 1мг/мл, к суспензии инкапсулированных клеток добавляли 1 мкл сток-раствора. После этого просматривали объекты в флуоресцентный микроскоп при облучении препарата светло-голубым светом (440 нм). FDA – нефлюоресцентный предшественник флуоресцеина, который свободно проходит через плазматическую мембрану. Попадая в клетку, он деацетируется неспецифическими эстеразами, в результате образуется флуоресцирующий продукт. Если мембрана клетки интактна, флуоресценция аккумулируется внутри клетки, обеспечивая тем самым интенсивное свечение. В том случае, если мембрана клетки повреждена или эстераза неактивна, интенсивность флуоресценции значительно снижается (Bell et al., 1988; Chrzanowski et al., 1984).

2.3.6 Подсчет количества неинкапсулированных клеток

Для подсчета количества неинкапсулированных клеток мы использовали метод флуоресцентной микроскопии. Образцы окрашивали родамином 1 мг/мл, при интенсивном перемешивании в течение 30 минут. Затем 3 раза промывали образец водой, для удаления несвязавшегося красителя. Образцы, окрашенные родамином, облучали светом с длиной волны 530 нм. Неинкапсулированные клетки обладали более интенсивной флуоресценцией, чем инкапсулированные.

2.3.7 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с помощью Microsoft Office Excel. Сначала мы убедились, что полученный ряд значений параметров клеток подчиняется законам нормального распределения. Для этого сравнивались среднее значение и медиана,

они оказались равны. Затем выборку описывали с помощью среднего значения и стандартного отклонения.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Инкапсуляция клеток *Saccharomyces cerevisiae*

Первостепенной задачей для нас явилось, выяснение оптимальных условий для протекания процесса инкапсуляции клеток в биоимитирующие оболочки карбоната кальция. Было показано, что инкапсуляция клеток в неорганические капсулы происходит только в том случае, когда концентрация клеток меньше, чем концентрация ионов кальция.

Как показано на рис. 6, при использовании исходных растворов, концентрация которых была 0.2 М и 0.4 М на поверхности клеток образовывались микросферы CaCO_3 . При использовании 0.33 М растворов происходила инкапсуляция клеток в CaCO_3 микросферы (рис. 7).

Для доказательства того, что внутри микрокапсул находятся клетки мы окрашивали капсулы ФДА. Известно, что ФДА флуоресцирует, только при деацетилировании эстеразами, которые функционируют в клетке. На рисунке 9 хорошо видна флуоресценция, поэтому можно заключить, что внутри находятся живые клетки дрожжей. Рисунки 7, 8 и 9 стоит рассматривать совместно, так как они показывают одно поле зрения при разных режимах микроскопа. На рисунке 8 видно свечение капсул на темном фоне. Это свидетельствует о том, что они состоят из карбоната кальция.

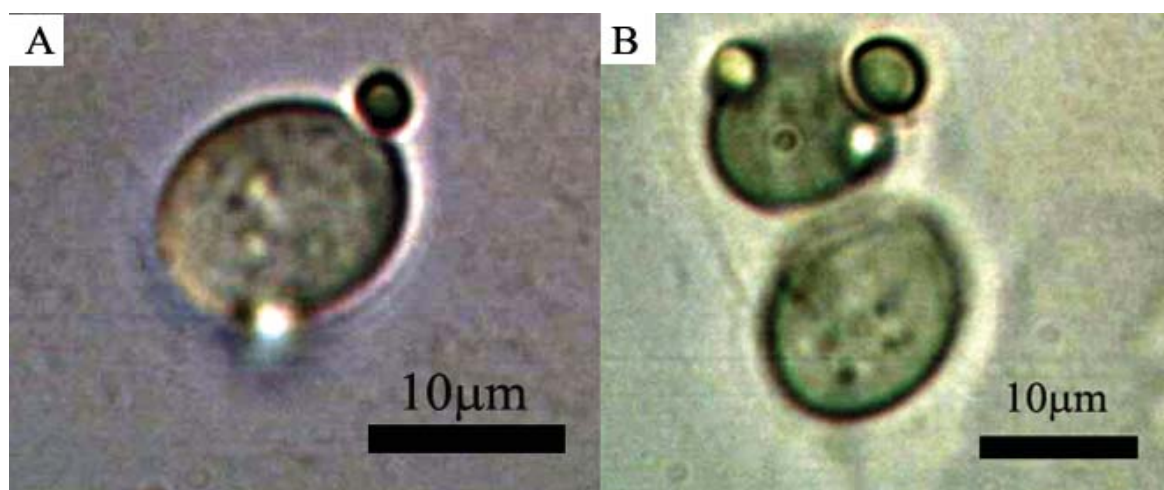


Рис. 6 Оптические микрофотографии клеток дрожжей с CaCO_3 сферами на поверхности. Получены при использовании различных концентраций солей А - 0.2 М растворы солей, В – 0.4 М растворы солей.

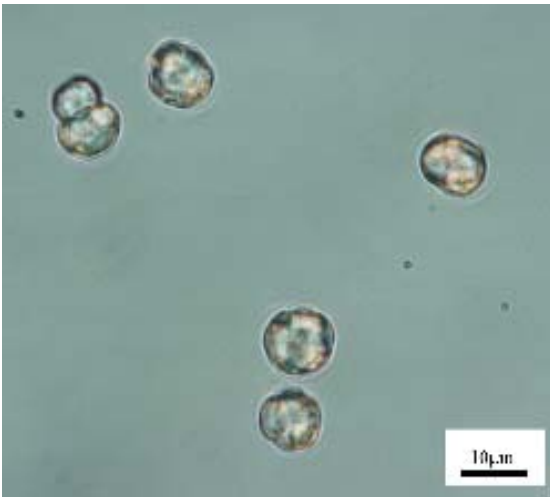


Рис. 7 Оптическая микрофотография CaCO_3 капсул (светлое поле).

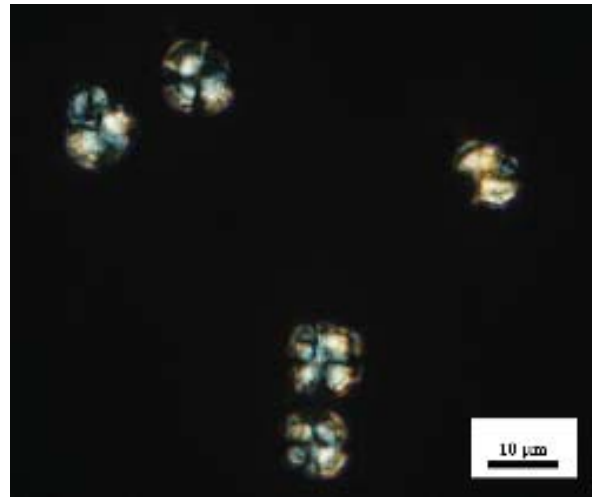


Рис. 8 CaCO_3 капсулы (поляризационная микроскопия).

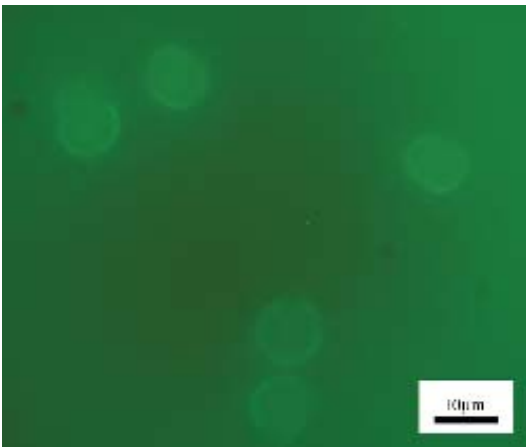


Рис. 9 CaCO_3 капсулы, окрашенные ФДА (флуоресцентная микроскопия).

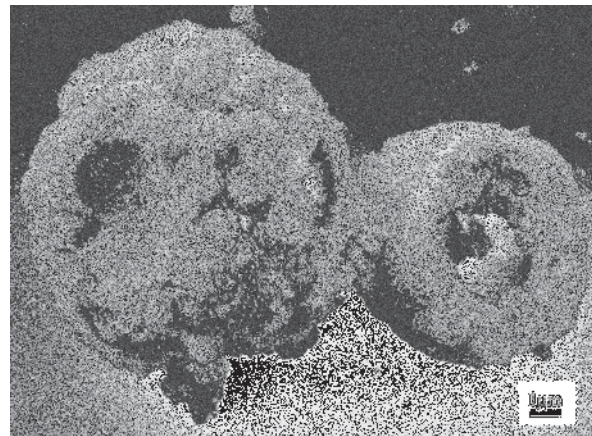


Рис. 10. Полые CaCO_3 микрокапсулы. (сканирующая электронная микроскопия).

Методы электронной микроскопии позволяют получить изображения в высоком разрешении. На рис. 10 представлено трехмерное изображение, полученное при помощи СЭМ. На нем показана поврежденная полая капсула из карбоната кальция. Мы предполагаем, что разрушение произошло в процессе подготовки образца. Как видно из рисунков 10 и 12, полученные микросферы из карбоната кальция являются пористыми структурами и обладают неровной поверхностью, а, следовательно, и большей площадью поверхности по сравнению с неинкапсулированными клетками (рис. 11)

Эти свойства могут быть использованы и в практических приложениях. Например, для иммобилизации различных макромолекул на поверхность микросфер, как описано в статье Володкина Д. В. (Volodkin et al., 2004)

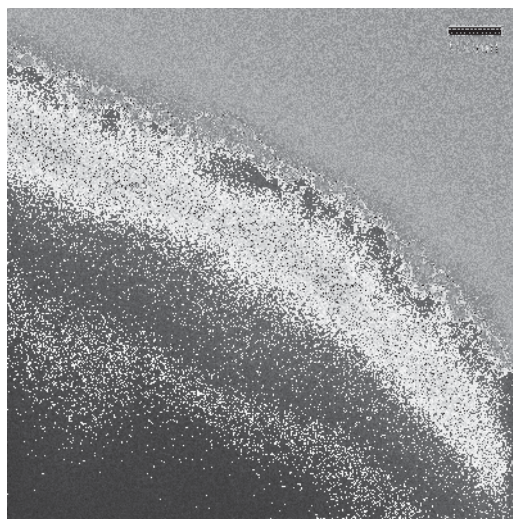
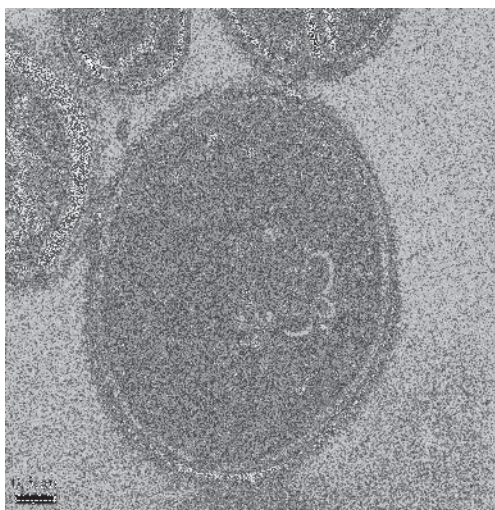


Рис. 11 Просвечивающая электронная микроскопия. Неинкапсулированная клетка *Saccharomyces cerevisiae*.

Рис. 12 Просвечивающая электронная микроскопия. Поверхность CaCO_3 микросферы.

3.2 Сравнительный анализ размеров клеток, заключенных в микросферы карбоната кальция

Нами был проведен сравнительный анализ размеров неинкапсулированных и инкапсулированных клеток *Saccharomyces cerevisiae* (Таблица 3).

Параметры клеток рассчитывали с помощью программы QImage по фотографиям, полученным ранее (рис. 13). Полученные данные статистически обрабатывались в Microsoft Office Excel. Были получены следующие результаты (Таблица 3). Как видно из данных таблицы, длина и ширина кальций карбонатных капсул примерно на 1 мкм больше, чем длина и ширина неинкапсулированных клеток. Кроме того, соотношение ширины и длины контроля и опыта практически схожи. Это еще одно доказательство того, что клетки находятся внутри капсул.

Таблица 3

Параметры инкапсулированных и неинкапсулированных клеток дрожжей

Параметр	Неинкапсулированные (контроль)	Инкапсулированные (опыт)
Длина (мкм)	5.8±1.3	7.4±2.74
Ширина (мкм)	4.8±1.4	6.4±2.4
Соотношение ширина/длина	0.82	0.85

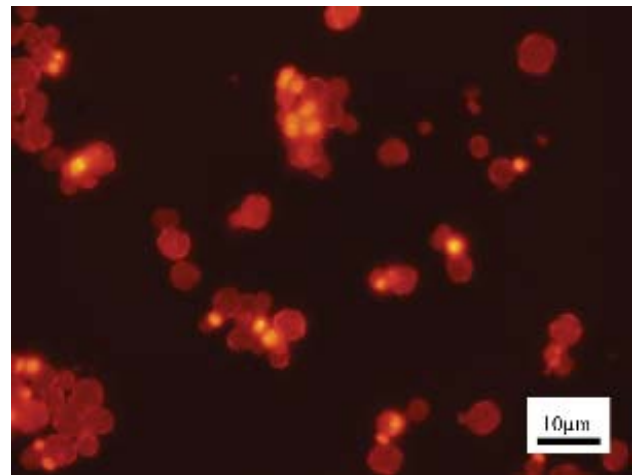
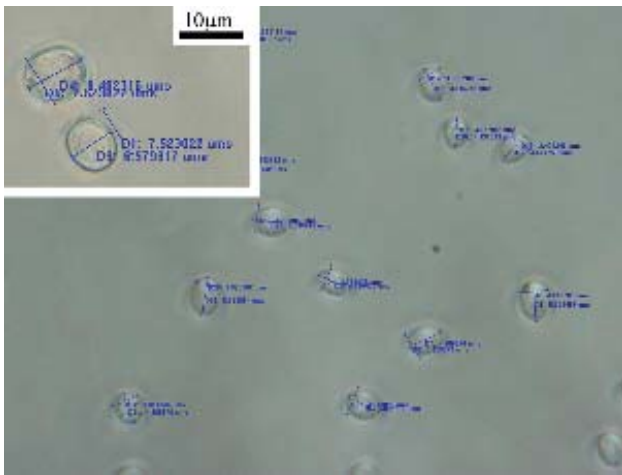


Рис. 13 Измерение параметров клеток *Saccharomyces cerevisiae* с помощью программы QImage. Вставка – Размеры инкапсулированных клеток.

Рис. 14 CaCO_3 капсулы и клетки *Saccharomyces cerevisiae*, окрашенные родамином.

В процессе работы было замечено, что не все клетки были заключены в CaCO_3 микросферы. Для подсчета количества неинкапсулированных клеток, мы окрашивали препарат микрокапсул родамином, как описано выше. Было показано, что неинкапсулированные клетки, окрашенные родамином, обладают более интенсивной флуоресценцией, чем инкапсулированные. Подсчет количества клеток проводился с помощью программы Image G, используя фотографии разных полей зрения. Процент неинкапсулированных клеток составил $24.5 \pm 4.01 \%$.

3.3 Инкапсуляция конидий *Trichoderma asperellum*

На следующем этапе нашей работы мы инкапсулировали конидии несовершенного гриба *Trichoderma asperellum*. Для характеристики полученных структур были использованы микроскопические методы исследования.

Было показано, что конидии *T. asperellum* обладают слабой автофлуоресценцией (рис. 16 - вставка). После окрашивания их ФДА интенсивность флуоресценции увеличилась в несколько раз (рис. 16). Из рисунков 15 и 16 видно, что полученные структуры содержат как живые клетки, так и кристаллический CaCO_3 , так как ФДА флуоресцирует только в живых клетках, а при поляризационной микроскопии клетки не видны, а светятся только кристаллические структуры.



Рис. 15 Поляризационная микроскопия. Конидии *Trichoderma asperellum* в CaCO₃ микрокапсулах.

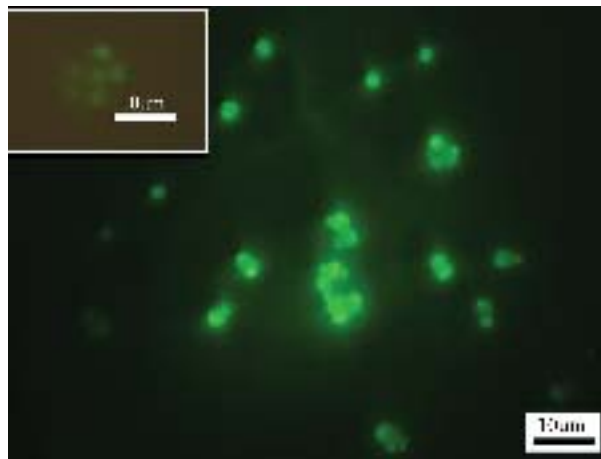


Рис. 16 Флуоресцентная микроскопия. Конидии *Trichoderma asperellum* в CaCO₃ микрокапсулах окрашены FDA. Вставка - автофлуоресценция неинкапсулированных конидий.

3.4 Культивирование конидий *T. asperellum*, заключенных в микрокапсулы CaCO₃

Конидии *Trichoderma asperellum* способны образовывать мицелий при определенных условиях. На рис. 17 показаны оптические микрофотографии контрольного (А, В) и опытного (С, D) образцов. В качестве контроля – неинкапсулированные конидии, а в качестве опыта – конидии, заключенные в CaCO₃ микрокапсулы.

Конидии, заключенные в CaCO₃ микрокапсулы не проросли после термостатирования (рис. 17 D). Стоит отметить, что после культивирования инкапсулированных конидий в питательной среде, изменилась морфология капсул. Если до помещения капсул в питательную среду и термостат они имели угловатую форму, то после термостатирования приобрели более округлую форму, кроме того капсулы увеличились в размерах.

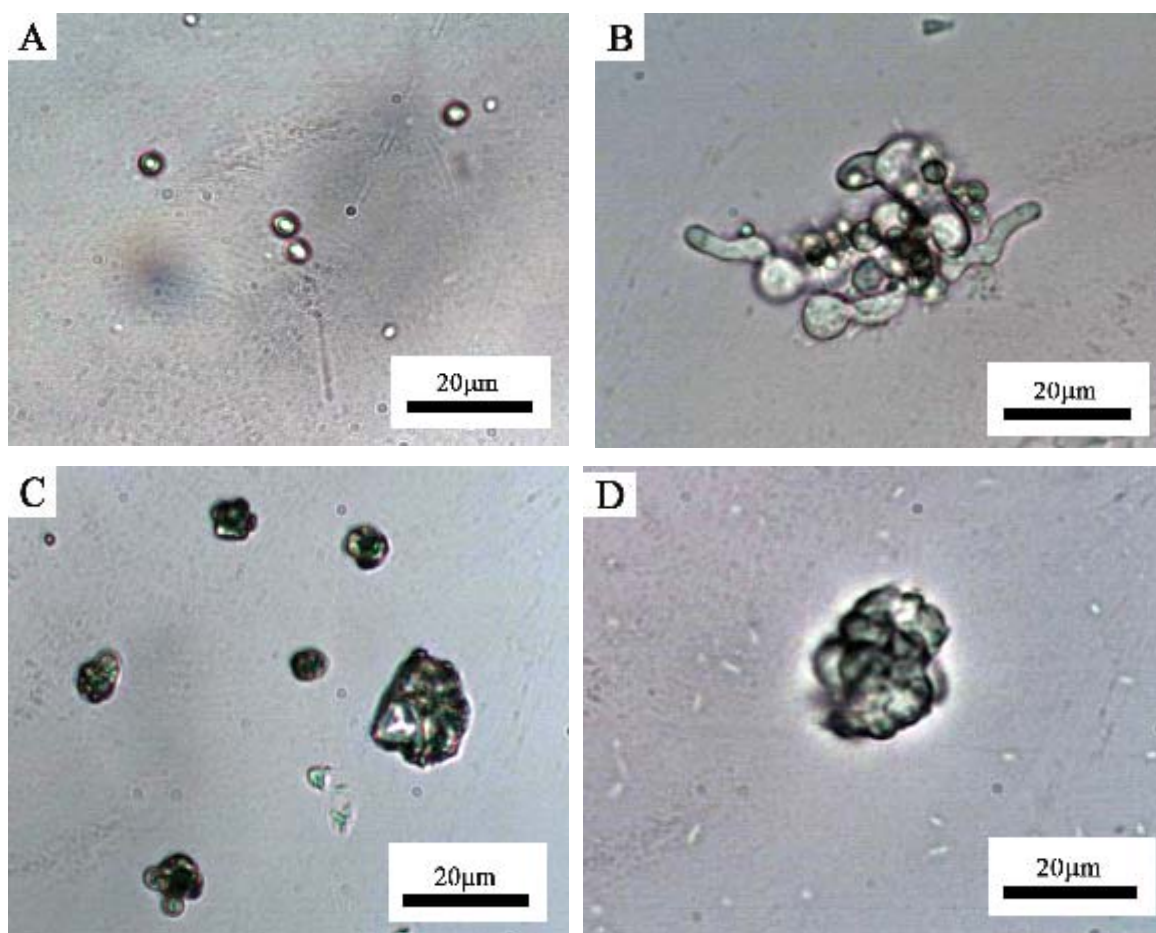


Рис. 17 Конидии *Trichoderma asperellum* до (А) и после (В) термостатирования 18 часов при 28°C. Инкапсулированные конидии до (С) и после (D) термостатирования. Оптическая световая микроскопия.

3.5 Инкапсуляция клеток водоросли *Dunaliella martima*

Далее мы предположили, что инкапсуляции в биоимитирующие CaCO_3 микрокапсулы можно подвергнуть любые одноклеточные микроорганизмы, в том числе и водоросли. Поэтому следующим объектом стала одноклеточная водоросль *Dunaliella martima*. Как и в опытах с дрожжами и *T. asperellum*, для характеристики и визуализации результатов использовались микроскопические методы исследования. Было показано, что клетки водоросли обладают интенсивной красной автофлуоресценцией (рис. 20). На рисунке 18 видно, что в составе полученных структур находятся живые клетки водорослей. Но в тоже время они окружены оболочкой карбоната кальция, что подтверждается поляризационной микроскопией (рис. 19).

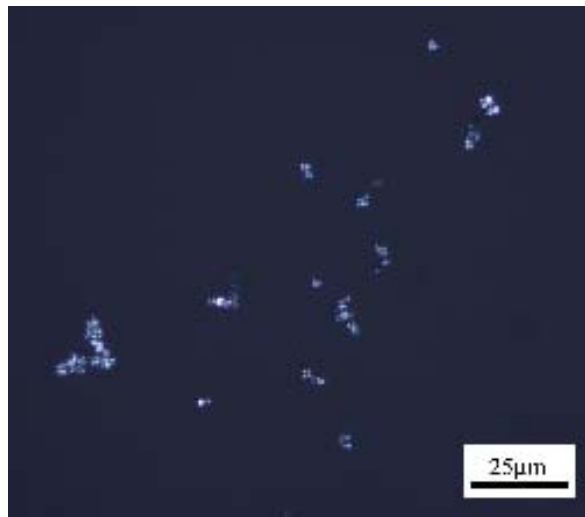
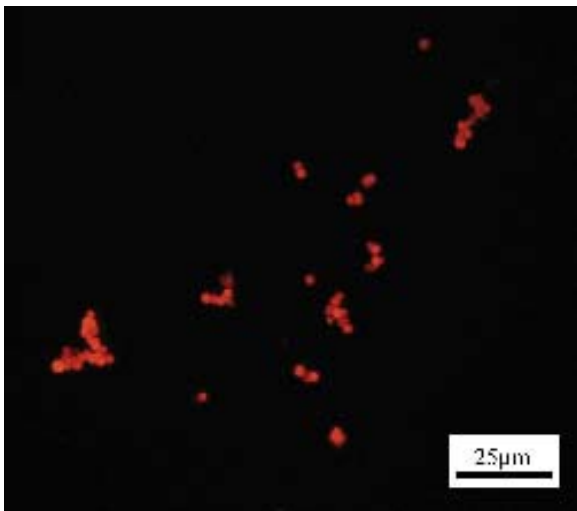


Рис. 18 Капсулы CaCO_3 , содержащие внутри клетки *Dunaliella martima*. Автофлуоресценция (флуоресцентная микроскопия).

Рис. 19 Поляризационная микроскопия. Капсулы CaCO_3 , содержащие внутри клетки *Dunaliella martima*.

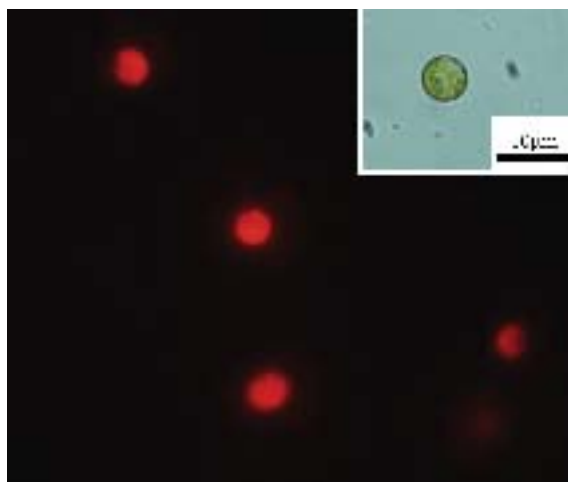


Рис. 20 Автофлуоресценция *Dunaliella martima* (флуоресцентная микроскопия). Вставка – клетка *Dunaliella martima* (светлопольная микроскопия)

3.6 Влияние pH на процесс инкапсуляции клеток

Следующим этапом нашей работы стало выяснение того, как влияет pH на форму и размер, образующихся капсул и на процесс инкапсуляции клеток.

При смешивании растворов солей, приготовленных на глицин-NaOH (pH=10.66) буфере, – наблюдалось много агрегатов в виде цепочек сфер, встречается кубический кальций карбонат (рис. 21 А).

При смешивании растворов солей, приготовленных на глицин-HCl (pH=2.01), – образуются более крупные капсулы, меньше агрегатов, кубический карбонат кальция не

встречаются (рис. 21 В). Стоит отметить, что выход продукта при $\text{pH}=10.66$ в 3-4 раза выше, чем при $\text{pH}=2.01$.

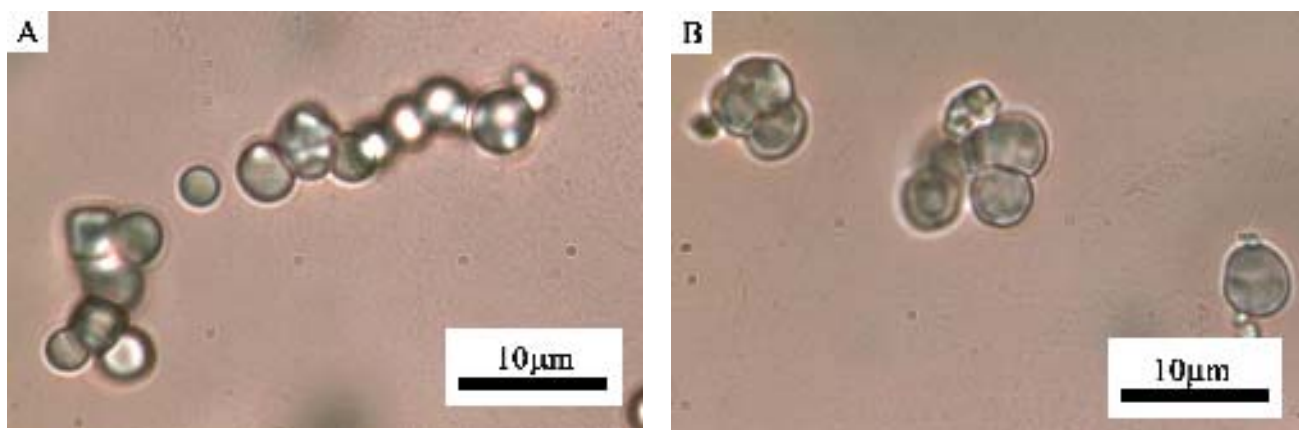


Рис. 21 Оптические микрофотографии инкапсулированных клеток дрожжей при смешивании растворов солей приготовленных на глицин-NaOH буфере ($\text{pH}=10.66$) – А; на глицин-HCl ($\text{pH}=2.01$) – В

Дальнейший синтез подобных структур мы предлагаем проводить в водных растворах, что позволяет избежать нежелательных примесей в изначальных растворах. Нежелательную агрегацию микрокапсул мы преодолеваем с помощью инкубации образцов в ультразвуковой бане в течение 15 минут.

ВЫВОДЫ

1. В результате нашей работы был получен новый класс гибридных биосовместимых микрокапсул, содержащих живые клетки в качестве матрицы.
2. Было показано, что инкапсулированные клетки остаются живыми.
3. Было показано, что в качестве кора для создания микрокапсул могут быть использованы как клетки микроорганизмов, так и клетки водорослей.
4. Полученные структуры были охарактеризованы микроскопическими методами.
5. Было показано, что pH влияет на форму капсул, степень и характер их агрегированности и выход продукта реакции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инге-Вечтомов, С. Г. Прионы дрожжей и центральная догма молекулярной биологии // Вестник Российской Академии Наук – 2000 – Т. 70, №4. - стр.299-306.
2. Тулякова, Т. В. Дрожжевые экстракты - безопасные источники витаминов минеральных веществ и аминокислот / Т. В. Тулякова, А. В. Пасхин, В. Ю. Седов // Пищевая промышленность – 2004. - стр.591-595.
3. Bell, R.S. Evaluation of fluorescein diacetate for flow cytometric determination of cell viability in orthopaedic research // R. S. Bell, L. A. Bourret, D. F. Bell, M. C. Gebhardt, A. Rosenberg, H. B. Berrey, B. V. Treadwell, W. W. Tomford, H. I. Mankin // J. Orthopaedic Res. – 1988. – Vol. 6. – P.467-474.
4. Caruso, F. Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating / F. Caruso, R. A. Caruso, H. Mohwald // Science. – 1998. – Vol. 282. – P.1111-1114.
5. Chen, L. Bacteria-mediated synthesis of metal carbonate minerals with unusual morphologies and structures / L. Chen, Y. Shen, A. Xie, B. Huang, R. Jia, R. Guo, W. Tang // Crystal growth & design. – 2009. – Vol. 9, № 2. – P.743-754.
6. Chrzanowski, T. H. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater / T. H. Chrzanowski, R. D.Crotty, J. G. Hubbard, R. P. Welch // Microb. Ecol. – 1984. – Vol. 10. – P.179-185.
7. Cox, M. Metal extractant chemistry. / M. Cox, D. S. Flett - NewYork Eds. John Wiley – 1983. - P.53-89.
8. Diaspro, A. Single living cell encapsulation in nano-organized polyelectrolyte shells / A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, A. Gliozzi // Langmuir. – 2002. – Vol. 18. – P.5047-5050.
9. Donath, E. Hollow polymer shells from biological templates: fabrication and potential applications / E. Donath, S. Moya, B. Neu, G.B. Sukhorukov, R. Georgieva, A. Voigt, H. Bäuml, H. Kiesewetter, H. Möhwald // Chem. Eur. J. – 2002. – Vol. 8, № 23. – P.5481-5485.
10. Fakhrullin, R. F. Fabrication of living cellosomes of rod-like and rhombohedral morphologies based on magnetically responsive templates // R. F. Fakhrullin and V. N. Paunov // Chem. Commun. – 2009. – P. 2511 – 2513.
11. Fakhrullin, R. F. Hybrid cellular–inorganic core–shell microparticles: encapsulation of individual living cells in calcium carbonate microshells / R. F. Fakhrullin and R. T. Minullina // Langmuir – 2009. – Vol. 25, № 12. – P. 6617–6621.

12. Franco, P. F. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* Strain T4 / P. F. Franco, H. M. Ferreira, E. X. Filho // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2004. – Vol. 6. – P. 32-40.
13. Green, D. W. Mineralized polysaccharide capsules as biomimetic microenvironments for cell, gene and growth factor delivery in tissue engineering / D. W. Green, S. Mann, R. O. C. Oreffo // *Soft Matter.* – 2006. – Vol. 2. – P. 732-737.
14. Hirai, T. Biomimetic Synthesis of Calcium Carbonate Particles in a Pseudovesicular Double Emulsion / T. Hirai, S. Hariguchi, I. Komazawa, R. J. Davey // *Langmuir.* – 1997. – Vol. 13, № 25. – P. 6650-6653.
15. Karimova, F. G. The oppositely directed Ca^{2+} and Na^{+} transmembrane transport in algae cells / F. G. Karimova, E. E. Kortchouganova, I. A. Tarchevsky, M. R. Iagoucheva // *Protoplasma.* – 2000. – Vol. 213. – P.93-98.
16. Kubicek, C. P. *Trichoderma and Gliocladium* / C. P. Kubicek, G. E. Harman // *Basic Biology, Taxonomy and Genetics.* – 1998. – Vol. 1. – P. 287.
17. Küther, J. Mercaptophenol-protected gold colloids as nuclei for crystallization of inorganic minerals: templated crystallization on curved surfaces / J. Küther, R. Seshadri, G. Nelles, W. Assenmacher, H.-J. Butt, W. Mader, W. Tremel // *Chem. Mater.* – 1999. – Vol. 11. – P.1317-1325.
18. Liang, P. Petunia-shaped superstructures of CaCO_3 aggregates modulated by modified chitosan / P. Liang, Q. Shen, Y. Zhao et al. // *Langmuir* – 2004. – Vol. 20. – P.10444-10448.
19. Li, Z. Living templates for Hierarchical Assembly of gold nanoparticles / Z. Li, S. Chung, J. Nam, D. S. Ginger, C. A. Mirkin // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2003. – Vol. 42. – P.2306-2309.
20. Ma, M. Nanostructured porous hollow ellipsoidal capsules of hydroxyapatite and calcium silicate: preparation and application in drug delivery / M. Ma, Y. Zhu, L. Li, S. Cao // *J. Mater. Chem.* – 2008. – Vol. 18. – P.2722-2727.
21. Naka, K. Delayed action of synthetic polymers for controlled mineralization of calcium carbonate // *Top Curr. Chem.* – 2007. – Vol. 271. – P.119-154.
22. Rautaray, D. Biosynthesis of CaCO_3 crystals of complex morphology using a fungus and an actinomycete / D. Rautaray, A. Ahmad, M. Sastry // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125, № 48. – P.14659-14657.
23. Rautaray, D. Biological synthesis of metal carbonate minerals using fungi and actinomycetes / D. Rautaray, A. Ahmad, M. Sastry // *J. Mater. Chem.* – 2004. – Vol. 14. – P.2333-2340.

24. Qi, R. Microwave-assisted synthesis of calcium carbonate (vaterite) of various morphologies in water-ethylene glycol mixed solvents / R. Qi, Y. Zhu // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – Vol. 110. – P.8302-8306.
25. Volodkin, D. V. Protein encapsulation via porous CaCO₃ microparticles templating / D. V. Volodkin, N. I. Larionova, G. B. Sukhorukov // *Biomacromolecules.* – 2004. – Vol. 5. – P.1962-1972.
26. Watanabe, H. Effect of initial pH on formation of hollow calcium carbonate particles by continuous CO₂ gas bubbling into CaCl₂ aqueous solution / H. Watanabe, Y. Mizuno, T. Endo, X. Wang, M. Fuji, M. Takahashi // *Advanced Powder Technology.* – 2009. – Vol. 20. – P.89-93.
27. Xiang, J. Crystallization and self assembly of calcium carbonate architecture / J. Xiang, H. Cao, J. H. Warner, A. R. Watt // *Crystal growth & Design.* – 2008. – Vol. 8, № 12. – P.4584-4587.