

*На правах рукописи*

**Мамченкова Полина Владимировна**

**Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum*  
с образованием наночастиц селена**

03.02.03 – микробиология

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Оболенск – 2019

Работа выполнена в лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, г. Саратов.

**Научные руководители:**

**Тугарова Анна Владимировна**, кандидат биологических наук (03.02.03 – микробиология и 03.01.04 – биохимия), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, лаборатория биохимии, старший научный сотрудник

**Камнев Александр Анатольевич**, доктор химических наук (02.00.04 – физическая химия), профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, лаборатория биохимии, ведущий научный сотрудник

**Официальные оппоненты:**

**Белимов Андрей Алексеевич**, доктор биологических наук (03.02.03 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», лаборатория ризосферной микрофлоры, главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией, г. Санкт-Петербург;

**Кокшарова Ольга Алексеевна**, доктор биологических наук (03.02.07 – генетика), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», лаборатория электрогенных фотопроцессов отдела фотобиофизики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, ведущий научный сотрудник, г. Москва.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Красноярск.

**Защита диссертации состоится** «28» февраля 2020 г. в 13-00 ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

**Автореферат разослан** «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 350.002.01

кандидат биологических наук

**Фурсова Надежда Константиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Изучение способности бактерий к трансформации соединений селена и, в частности, токсичных оксоанионов селена – селенитов и селенатов – остается актуальной областью исследований на сегодняшний день. Внимание исследователей привлекает возможность использования бактерий, способных к восстановлению указанных соединений селена, в очистке сточных вод производств, а также загрязненных селеном почв и водоемов. Помимо этого, в результате восстановления оксоанионов селена бактериями образуются наночастицы элементарного селена ( $\text{Se}^0$ ) (Dowdle & Oremland, 1998). Последние можно использовать в технике и микроэлектронике для создания солнечных батарей, сенсоров и т.д. (Shirsat *et al.*, 2015; Wadhvani *et al.*, 2016). Восстановление селенит-ионов с использованием бактерий относится к зеленой химии. Такой синтез отличается большей безопасностью в связи с ограничением использования токсичных соединений и, соответственно, возможностью использования получаемых селеновых наночастиц (Se-НЧ) без дополнительной очистки в медицине и животноводстве в качестве биодобавок для предотвращения селенодефицита, а также для терапии раковых заболеваний. Было показано, что биологически синтезированные Se-НЧ отличаются от наночастиц, полученных другими способами, по структуре и свойствам (Oremland *et al.*, 2004). Свойства наночастиц, полученных с помощью разных бактерий, также могут различаться. Основными проблемами при получении Se-НЧ с помощью бактерий являются их гетерогенность по размерам, небольшая скорость синтеза и зачастую внутриклеточное нахождение Se-НЧ, что затрудняет их очистку.

Восстановление оксоанионов селена бактериями может включать разные метаболические процессы с участием различных групп ферментов, белков или пептидов (Nancharaiah & Lens, 2015). В восстановлении селенитов у бактерий, скорее всего, одновременно участвуют несколько биохимических путей. Бактериальное восстановление селенатов, содержащих Se в степени окисления +6 ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), встречается гораздо реже, чем селенитов (степень окисления +4;  $\text{SeO}_3^{2-}$ ). В частности, для бактерии *Azosprillum brasilense* показана способность к восстановлению селенитов, но не селенатов (Tugarova *et al.*, 2014). Несмотря на большое количество публикаций на эту тему, до сих пор не выяснено, как именно происходит данный процесс и каковы его особенности у различных микроорганизмов. Таким образом, механизмы восстановления селенит-ионов и формирования в процессе этого наноразмерных частиц элементарного селена требуют дальнейшего изучения.

Изучение механизмов восстановления селенит-ионов микроорганизмами, в частности, азоспириллами – биотехнологически важными и широко изучаемыми бактериями, может дать ключ к лучшему пониманию биогеохимических циклов соединений селена, а также к управлению восстановлением селенит-ионов для использования таких бактерий в качестве клеточных фабрик для получения Se-НЧ.

**Степень разработанности темы исследования.** Первые работы, показывающие способность бактерий восстанавливать оксоанионы селена, были опубликованы в конце 80-х годов XX в. (Macy *et al.*, 1989; Oremland *et al.*, 1989). Механизмы, лежащие в основе такого восстановления, изучены для ряда микроорганизмов, в основном, анаэробов, использующих селенаты для анаэробного дыхания (Macy *et al.*, 1993; Oremland *et al.*, 1994; Stolz & Oremland, 1999; Nancharaiah & Lens, 2015). В настоящее время активно изучаются механизмы восстановления селенит-ионов бактериями (Lampis *et al.*, 2014), бактериальный синтез Se-НЧ, их свойства (Blum *et al.*, 1998;

Oremland *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 2009) и применение (Nancharaiyah & Lens, 2015; Shirsat *et al.*, 2015; Wadhvani *et al.*, 2016). Недостатками бактериального синтеза является внутриклеточная локализация образующихся Se-НЧ, их гетерогенность по размерам, а также невысокая скорость синтеза. Исследования, посвященные изучению механизмов восстановления селенитов бактериями рода *Azospirillum*, отсутствуют, хотя отдельные работы по изучению восстановления селенит-ионов азоспириллами в литературе есть (первая публикация – Тугарова и соавт., 2013; Vogel *et al.*, 2018).

**Цель работы:** исследование механизмов восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* для получения наночастиц селена и характеристика последних. Для достижения поставленной цели были поставлены и решены нижеследующие задачи.

1. Определение способности ряда бактерий рода *Azospirillum* к восстановлению селенита и образованию наночастиц селена.

2. Подбор условий синтеза наночастиц селена с экстраклеточной локализацией с помощью бактерий рода *Azospirillum*.

3. Характеристика полученных и очищенных наночастиц селена с использованием биохимических и инструментальных методов.

4. Исследование биологической активности выделенных и очищенных наночастиц селена.

5. Изучение участия протон-зависимого транспорта, редокс-системы глутатиона и системы денитрификации в процессе восстановления селенит-ионов с образованием наночастиц селена у азоспирилл.

**Научная новизна.** Предложена оригинальная методика синтеза Se-НЧ с помощью азоспирилл, позволяющая получать гомогенные по размерам наночастицы с экстраклеточной локализацией за достаточно короткое время (1 сут). Впервые была исследована токсичность селенита для 7 различных видов азоспирилл (*A. lipoferum*, *A. halopraeferens*, *A. thiophilum*, *A. zaeae*, *A. formosense*, *A. palatum*, *A. picis*) и установлено, что все исследованные виды способны восстанавливать селенит и образовывать Se-НЧ. Впервые показано участие протон-зависимого транспорта в процессе выноса зародышей селеновых наночастиц через мембрану при восстановлении селенит-ионов азоспириллами с формированием наночастиц селена. Определена важная роль системы денитрификации в этом процессе. Установлено, что у азоспирилл восстановление с участием редокс-системы глутатиона, считающееся основным механизмом для детоксификации  $\text{SeO}_3^{2-}$ , не играет существенной роли.

**Научно-практическая значимость исследования.** Установлено, что один из изучаемых видов азоспирилл, *A. thiophilum*, способен выдерживать до 15 мМ селенита, что позволяет рекомендовать данный штамм для использования в биоремедиации земель и водоемов, загрязненных селеном. Методика, разработанная для получения Se-НЧ с помощью азоспирилл, применима для синтеза с использованием других бактерий, в частности, *E. coli*. Полученные с помощью азоспирилл Se-НЧ оказывали токсическое действие на клетки культуры HeLa, из чего следует возможность использования таких Se-НЧ при разработке препаратов для терапии раковых заболеваний. Получены новые данные о восстановлении селенит-ионов, что способствует лучшему пониманию роли микроорганизмов в биогеохимическом цикле селена и бактериальных механизмов защиты от токсического действия соединений селена. Результаты, полученные с помощью инфракрасной фурье-спектроскопии (ИКФС), свидетельствуют, что в процесс формирования Se-НЧ включаются биологические макромолекулы, определяющие

стабильность суспензий получаемых наночастиц. Определены основные принципы для регулирования параметров получаемых Se-НЧ. Материалы диссертации использованы в учебной программе аспирантуры ИБФРМ РАН при чтении лекций и выполнении практических занятий курса «Спектроскопические методы в биохимии и микробиологии» (Справка № 106-01-1.2-505 от 22.11.2019 г.).

**Личное участие соискателя.** Все экспериментальные данные, представленные в диссертационной работе, были получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, анализ и обсуждение полученных данных, а также обработку, оформление и публикацию результатов.

**Достоверность результатов исследований.** Экспериментальные исследования выполнены в достаточном объеме, статистически достоверны. Использован ряд современных микробиологических, биохимических и инструментальных методов; при этом было использовано сертифицированное оборудование. Всё вышеперечисленное определяет достоверность полученных результатов. Выводы диссертационной работы практически и теоретически обоснованы, соответствуют цели и задачам исследования.

**Апробация работы.** Материалы были представлены на 19 научных мероприятиях (из них 11 международных и 8 российских): Региональной научной конференции «Исследования молодых ученых и студентов в биологии и экологии» (Саратов, 15–18 апреля 2013 г.; 20–24 апреля 2015 г.), XXVII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 9–12 февраля 2015 г.), The 5th International Selenium Seminar “Selenium: Biology, Clinical and Preventive Medicine, Nutrition” (Москва–Ярославль, 21–25 сентября 2015 г.), Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов» (Томск, 26–28 апреля 2016 г.), XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 26–29 апреля 2016 г.), International Conference on Biochemistry and Molecular Biology (Венеция, Италия, 27–29 апреля 2016 г.), 33<sup>rd</sup> European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS) (Сегед, Венгрия, 30 июля – 04 августа 2016 г.), VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 26–30 сентября 2016 г.), Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения – 2016» (Саратов, 24–25 ноября 2016 г.), 2nd Caparica Christmas Conference on Sample Treatment (Кошта-да-Капарика, Португалия, 5–7 декабря 2016 г.), Colloquium Spectroscopicum Internationale XL (Пиза, Италия, 11–16 июня 2017 г.), Всероссийской научной конференции и школе для молодых ученых с международным участием «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, 18–24 сентября 2017 г.), I Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, 17–18 октября 2017 г.), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» (Москва, 9–13 апреля 2018 г.), Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC 2018 (Уфа, 13–17 июня 2018 г.), 43rd FEBS Congress “Biochemistry Forever” (Прага, Чешская Республика, 7–12 июля 2018 г.), 18th European Congress on Biotechnology (Женева, Швейцария, 1–4 июля 2018 г.), II Российском микробиологическом конгрессе (Саранск, 23–27 сентября 2019 г.).

**Связь работы с научными программами.** Отдельные этапы работы выполнены в соответствии с Госзаданием в рамках тем: «Роль биомакромолекул и

низкомолекулярных веществ в механизмах адаптации растительно-микробных ассоциаций в составе антропобиоценозов к условиям аридного климата» (№ ГР 01201359049, 2013–2017 гг.); «Структурно-функциональная характеристика биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, определяющих формирование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания». (№ ГР АААА-А17-117102740102-2, 2018 г.); «Выявление структурно-функциональных особенностей биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, детерминирующих образование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания» (№ ГР АААА-А19-119011890162-3, 2019–2021 гг.).

Диссертационная работа выполнялась при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-08-01302-а).

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 19 печатных работах, из них 4 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 253 источника, в том числе – 245 зарубежных. Работа изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 33 рисунка и 5 таблиц.

## ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Бактерии рода *Azospirillum* (*A. formosense* CC-Nfb-7, *A. picis* IMMIB TAR-3, *A. halopraeferens* Au4, *A. palatum* ww 10, *A. zea* N7, *A. thiophilum* BV-S и *A. lipoferum* Sp59b) способны к восстановлению селенит-ионов до  $Se^0$  в виде Se-НЧ. Наиболее устойчивым из всех исследованных видов азоспирилл к токсическому действию селенит-ионов является *A. thiophilum* BV-S.

2. Оригинальная методика синтеза Se-НЧ с экстраклеточной локализацией бактериями включает инкубацию отмытых от компонентов среды бактериальных клеток с селенитом без питательных веществ и простую процедуру очистки с использованием центрифугирования и фильтрования. Размер получаемых Se-НЧ контролируется начальной концентрацией селенита.

3. Se-НЧ, полученные с помощью *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S, однородны по размеру, имеют отрицательный дзета-потенциал в диапазоне от –18,5 до –23,7 мВ. Селен в составе наночастиц находится в аморфной модификации. Se-НЧ, полученные с помощью обоих штаммов, содержат в своем составе биомакромолекулы: белки, полисахариды и липиды. В составе Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7, присутствуют белки массой 96 и 25 кДа (определено методом ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях).

4. Se-НЧ, полученные с помощью *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S, ингибируют клеточное дыхание культуры HeLa.

5. Перенос селенит-ионов в клетку происходит без участия протон-зависимого транспорта. Вынос зародышей Se-НЧ из клетки проходит с участием протон-зависимого транспорта. В трансформации селенит-ионов у азоспирилл участвует система денитрификации, при этом редокс-система глутатиона не играет существенной роли.

## МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследований.** В работе использованы бактерии, полученные из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (WDCM 1021,

www.collection.ibppm.ru): *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245, *A. lipoferum* Sp59b, *A. halopraeferens* Au4, *A. thiophilum* BV-S, *A. zea* N7, *A. formosense* CC-Nfb-7, *A. palatum* ww 10, *A. picis* IMMIB TAR-3 и *E. coli* K-12. Производные штамма *A. brasilense* Sp7, имеющие различия в скорости нитритредукции, – *A. brasilense* Sp7.1, *A. brasilense* Sp7.3 и *A. brasilense* Sp7.4 – предоставлены сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Культивирование бактерий рода *Azospirillum* проводили на модифицированной синтетической малатной среде (СМС), предложенной Дэй и Доберейнер (Day & Döbereiner, 1976). Для штамма *A. halopraeferens* Au4 содержание NaCl в среде составляло 5 г/л. Все используемые штаммы бактерий рода *Azospirillum* выращивали в периодической культуре при 28–31°C, штамм *A. halopraeferens* Au4 – при 37°C. *E. coli* K-12 выращивали на среде LB (Bertani, 1951) в периодической культуре при 37°C.

**Определение влияния селенит-ионов на рост бактерий рода *Azospirillum*.** Влияние Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> на рост бактерий на жидкой среде определяли по уменьшению оптической плотности (ОП) по сравнению с культурой, росшей без селенита. ОП измеряли на спектрофотометре Spekol 221 (Германия);  $\lambda = 595$  нм. Восстановление SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> до Se<sup>0</sup> определяли по изменению окрашивания среды до различных оттенков красного цвета. Образование Se-НЧ наблюдали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

**Получение наночастиц селена с использованием азоспирилл.** Для разработки схемы синтеза Se-НЧ использовали культуры штаммов *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245 и *A. thiophilum* BV-S, выращенные в течение 18 ч с ОП = 0,8–1,0 (~4×10<sup>9</sup> кл./мл). Клетки отмывали от компонентов среды и ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе (ФР).

Для оптимизации условий синтеза Se-НЧ проводили инкубацию клеток при изменении следующих условий: (1) концентрации Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> от 1 до 100 мМ; (2) плотности бактериальных клеток; (3) pH растворов: использовали буферные растворы по Макилвейну с pH 3–7, фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с pH 7,3 и ФР с pH 5,5. Суспензии инкубировали в термостате при 32°C, проводя мониторинг синтеза Se-НЧ в течение 24 ч с использованием ПЭМ и оценивая скорость и интенсивность окрашивания суспензий.

Для выделения Se-НЧ клетки осаждали центрифугированием. Надосадов пропускали через стерильные фильтры (Ø пор 0,22 или 0,45 мкм). Se-НЧ отмывали деионизированной водой, ресуспендировали в 50–100 мкл деионизированной воды. Se-НЧ были охарактеризованы с помощью методов динамического рассеяния света (ДРС) и ПЭМ. ДРС и измерение дзета потенциала проводили с помощью двухуглового анализатора размеров частиц и молекул Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). ПЭМ проводили на микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Размеры наночастиц также определяли по микрофотографиям ПЭМ с помощью программы ImageJ (версия 1.50d).

**Характеристика наночастиц, полученных с помощью бактерий рода *Azospirillum*, методом ИК-фурье-спектроскопии.** Водные суспензии Se-НЧ наносили на диски из ZnSe (R'AIN Optics, Россия) и высушивали при 45°C до образования тонких пленок. Спектры измеряли в режиме пропускания на спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation, США) и обрабатывали с помощью программы OMNIC (8.2.0.387).

**Характеристика наночастиц, полученных с помощью бактерий рода *Azospirillum*, с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР).** Водные суспензии Se-НЧ наносили на алюминиевую фольгу или стекло и высушивали при

комнатной температуре. Спектры измеряли на спектрометре Peak Seeker Pro 785 (Ocean Optics, Великобритания;  $\lambda = 785$  нм, мощность излучения 30 мВт; спектральный диапазон 150–2100 см<sup>-1</sup>). Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel 2010.

**Электрофоретическое и иммунохимическое исследование биомакромолекулярной составляющей Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7.** Для выделения биополимеров с поверхности Se-НЧ использовали буферы следующего состава: 1) сахараза – 0,5 М; ЭДТА – 3 мМ; Трис/НСl рН 8,0 – 100 мМ; 2) Трис/НСl, рН 8,0 – 0,1 М; натрия додецилсульфат – 10%. Se-НЧ в суспензии трижды обрабатывали ультразвуком (Elmasonic S10H, Elma, Германия; рабочая частота 37 кГц; 20 мин). Концентрация белка была определена по модифицированному методу Бредфорда (Bradford, 1976). Электрофорез проводили на пластинках ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли (Laemmli, 1970).

**Дот-блот-анализ.** На нитроцеллюлозную мембрану наносили растворы Se-НЧ и биополимеров, инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Полиэтиленгликоль (0,05%,  $M_r$  20000 Да) был использован для блокирования сайтов связывания нитроцеллюлозы. Ферментативную реакцию проводили в 0,05% растворе 3,3'-диаминобензидина в ФСБ (рН 7,3) с добавлением 0,02% перекиси водорода.

**Иммуноферментный анализ.** Суспензии Se-НЧ и биополимеров вносили в ячейки 96-луночного планшета. Сорбцию препаратов осуществляли в течение ночи при +4°C. Для проведения ферментативной реакции в лунки планшета вносили 0,03% раствор о-фенилендиамина в 0,1 М цитратном буфере (рН 4,5) с добавлением 0,02% перекиси водорода. Развитие окраски останавливали добавлением 100 мкл раствора 1 н. серной кислоты. Измерение ОП растворов проводили на планшетном ридере Multiscan Ascent (Thermo, Финляндия;  $\lambda = 492$  нм).

В обоих вариантах иммунохимического исследования использовали поликлональные кроличьи антитела к нативным клеткам *A. brasilense* штаммов Sp7 (Shelud'ko *et al.*, 2010) и Sp245 (Guliy *et al.*, 2007), а также антитела к липополисахариду (Konnova *et al.*, 2008) и флагеллину штамма *A. brasilense* Sp7 (Burygin *et al.*, 2007). Вторичными антителами служили конъюгаты анти-кроличьих антител с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch).

**Определение цитотоксичности суспензий Se-НЧ по дыхательной активности на клетках HeLa.** Дыхательную активность определяли по стандартной методике (Bernas & Dobrucki, 2000). В работе использованы клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), предоставленные сотрудниками лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН. Клетки культивировали в питательной среде ДМЕМ (БиолоТ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (БиолоТ). Концентрацию селена в суспензиях Se-НЧ определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре Thermo Scientific iCE 3500 (Thermo Scientific, США).

**Ингибирование протонной помпы.** Использовали ингибитор протонной помпы карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон (КЦХФ). Клетки *A. brasilense* Sp245, выращенные в течение 18 ч и отмытые от компонентов среды, были обработаны КЦХФ (конечные концентрации 10 и 25 мкМ) в течение 50 мин, а затем отмыты от ингибитора. Далее клетки инкубировали в ФР в присутствии 10 мМ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> в термостате при 32°C в течение 24 ч.

**Выделение белков клеточной поверхности, внешней мембраны и периплазмы *A. brasilense* Sp7.** Клетки штамма *A. brasilense* Sp7, выращенного в

течение 7 сут в присутствии 0,05–5 мМ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> и без селенита, были осаждены центрифугированием и отмыты с ФСБ (рН 7,3). Клетки ресуспендировали в 200 мкл экстрагирующего буфера, содержащего следующие компоненты (на 10 мл): Трис – 120 мг; ЭДТА – 37 мг; фенилметилсульфонилфторид (в виде 2% раствора в C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН) – 8,7 мкл; Triton X-100 – 100 мкл (рН 8,05 – 8,5). Суспензию инкубировали при комнатной температуре 30 мин, клетки осаждали центрифугированием. Надосадок был отобран в пробирки Эппендорфа.

**Ингибирование синтеза глутатиона.** Использовали ингибитор синтеза глутатиона – бутионинсульфоксимин (БСО). *A. brasilense* Sp7 выращивали аэробно в течение 7 сут на жидкой среде. В опыте было исследовано восстановление селенит-ионов в присутствии 2 мМ БСО и без БСО. Концентрация Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> составляла 2 мМ. На 7-е сут роста культуры были исследованы с помощью ПЭМ.

**Восстановление селенит-ионов производными штамма *A. brasilense* Sp7, различающимися по скорости нитритредукции.** Клетки штамма *A. brasilense* Sp7 и его производных – *A. brasilense* Sp7.1, *A. brasilense* Sp7.3 и *A. brasilense* Sp7.4 – были выращены в течение 18 ч, отмыты от компонентов среды, а затем помещены в ФР. Концентрация бактериальных клеток составляла 16×10<sup>9</sup> кл./мл в каждом варианте. Для определения скорости восстановления нитрита к полученным суспензиям добавляли NaNO<sub>2</sub> до конечной концентрации 1,5 мкг/мл. Концентрацию NO<sub>2</sub><sup>-</sup> определяли спектрофотометрически с использованием реактива Грисса (Nicolas & Nason, 1957). Для определения скорости селенитредукции к бактериальным суспензиям добавляли Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> до конечной концентрации 5 мМ и инкубировали в термостате при 32°C. Изменение окраски суспензий фиксировали каждый час в течение первых 7 ч и в конце инкубации – через 24 ч; затем образцы суспензий были исследованы с помощью ПЭМ. Концентрацию селенита определяли спектрофотометрически (Li *et al.*, 2014).

Математическую обработку данных проводили с использованием статистического пакета анализа данных программы Microsoft Excel 2003.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

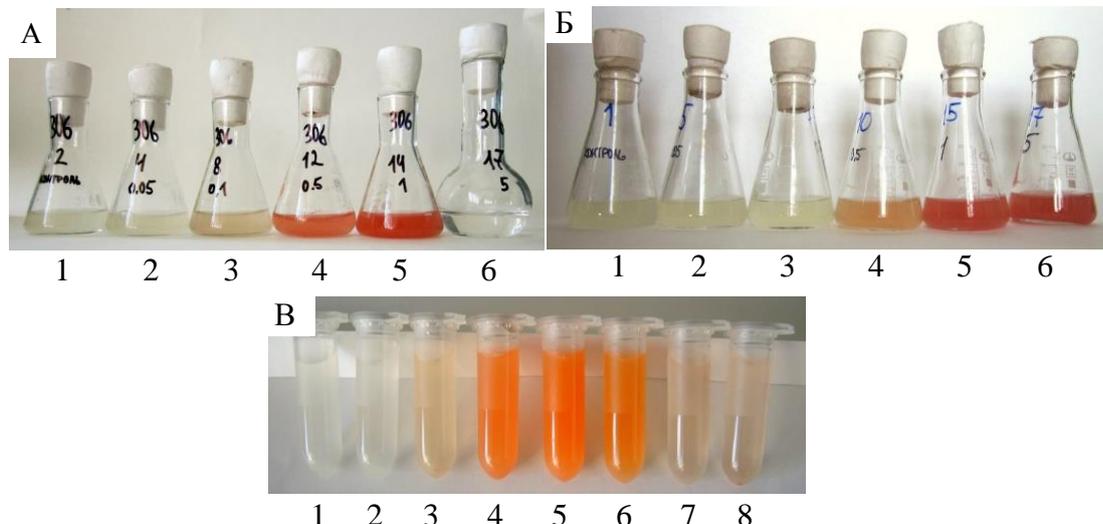
### Влияние селенит-ионов на рост бактерий рода *Azospirillum* и определение их способности к образованию Se-НЧ

Изучено влияние Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> для семи видов азоспирилл с использованием типовых штаммов: *A. formosense* CC-Nfb-7, *A. picis* IMMIB TAR-3, *A. halopraeferense* Au4, *A. palatum* ww 10, *A. zea* N7, *A. thiophilum* BV-S и *A. lipoferum* Sp59b. Был использован диапазон концентраций селенита от 0,05 до 15 мМ.

Восстановление селенит-ионов определяли по окрашиванию бактериальных культур в оттенки красного цвета, свидетельствующего о присутствии в среде Se<sup>0</sup> (Hunter & Manter, 2009, Roux *et al.*, 2001). Как было показано ранее, для штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245, восстановление ионов SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> начинается после значительного удлинения лаг-фазы (Tugarova *et al.*, 2014, Vogel *et al.*, 2018). Для всех исследованных видов было также показано замедление бактериального роста под действием селенита, поэтому культивирование было продлено до 7 сут.

На 7-е сут наиболее чувствительным к действию селенита был *A. halopraeferens* Au4. При 0,5 мМ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> и выше рост данного штамма не восстанавливался в течение 7 сут. При концентрациях 0,05 и 0,1 мМ на 7 сут наблюдалось интенсивное красное окрашивание. Рост *A. formosense* CC-Nfb-7 в присутствии 5 мМ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> не восстанавливался (рис. 1А), при концентрациях 0,1–1 мМ наблюдалось окрашивание от розоватого до красного. Для *A. lipoferum* Sp59b на 7-е сут роста при 0,5–5 мМ

наблюдается окрашивание, увеличивающееся с ростом концентрации селенита от светло-оранжевого до розовато-оранжево-красного при 5 мМ (рис. 1Б). Рост и картина восстановления у бактерий видов *A. picis* IMMIB TAR-3 и *A. palatum* ww 10 на 7-е сут аналогична представленному на рис. 1Б для *A. lipoferum* Sp59b.



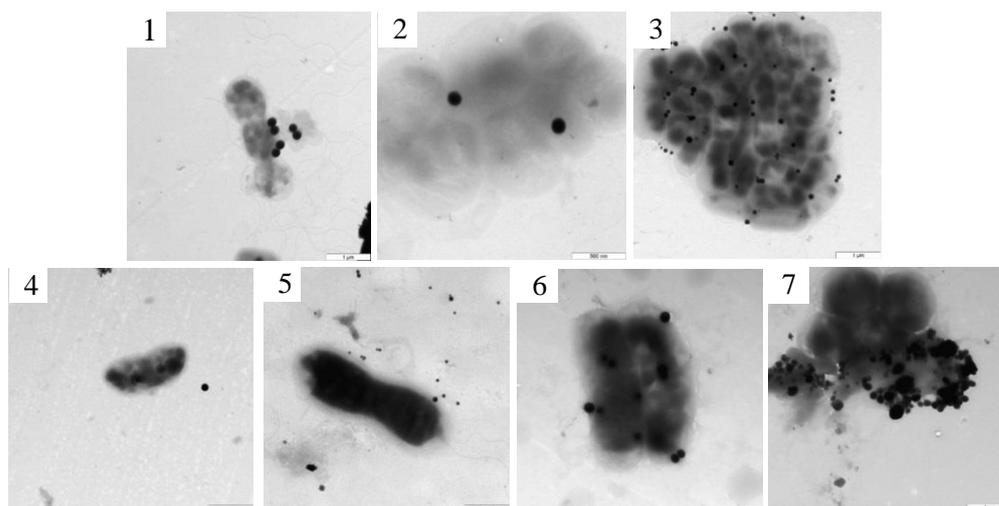
А – *A. formosense* CC-Nfb-7; Б – *A. lipoferum* Sp59b; В – *A. thiophilum* BV-S; 1 – контроль, культура без  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; 2 – 0,05 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; 3 – 0,1 мМ, 4 – 0,5 мМ; 5 – 1 мМ; 6 – 5 мМ; 7 – 10 мМ; 8 – 15 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

Рисунок 1 – Бактерии рода *Azospirillum*, выращенные в течение 7 сут в присутствии различных концентраций селенита.

Для *A. thiophilum* BV-S окрашивание на 7-е сут наблюдалось при концентрациях 0,1 – 15 мМ (рис. 1В). Слабый рост культуры наблюдался даже при 15 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

Рост бактерии *A. zeae* N7 не прекращался даже в присутствии 5 мМ селенита, при этом культура заметно флокулировала.

Все исследованные виды оказались способны к синтезу Se-НЧ (рис. 2).



1 – *A. palatum* ww 10 (5 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ); 2 – *A. picis* IMMIB TAR-3 (5 мМ); 3 – *A. lipoferum* Sp59b (1 мМ); 4 – *A. halopraeferens* Au4 (0,1 мМ); 5 – *A. zeae* N7 (5 мМ); 6 – *A. thiophilum* BV-S (0,5 мМ); 7 – *A. formosense* CC-Nfb-7 (0,5 мМ). Бактериальные культуры выращивали в течение 7 сут при 31°C в аэробных условиях в присутствии указанных в скобках концентраций селенита (бар – 1 мкм; панель 2 – 0,5 мкм).

Рисунок 2 – Способность бактерий рода *Azospirillum* к образованию наночастиц селена в процессе роста на жидкой среде, содержащей селенит.

Таким образом, была показана способность всех исследуемых видов азоспирилл к восстановлению селенит-ионов с образованием Se-НЧ. Самый устойчивый к  $\text{SeO}_3^{2-}$  из исследованных нами азоспирилл штамм – *A. thiophilum* BV-S – способен выдерживать до 15 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  в процессе роста на жидкой среде. Для дальнейшей работы были использованы наиболее изученные штаммы *A. brasilense* Sp7 и Sp245, а также штамм *A. thiophilum* BV-S (как наиболее устойчивый к действию селенита).

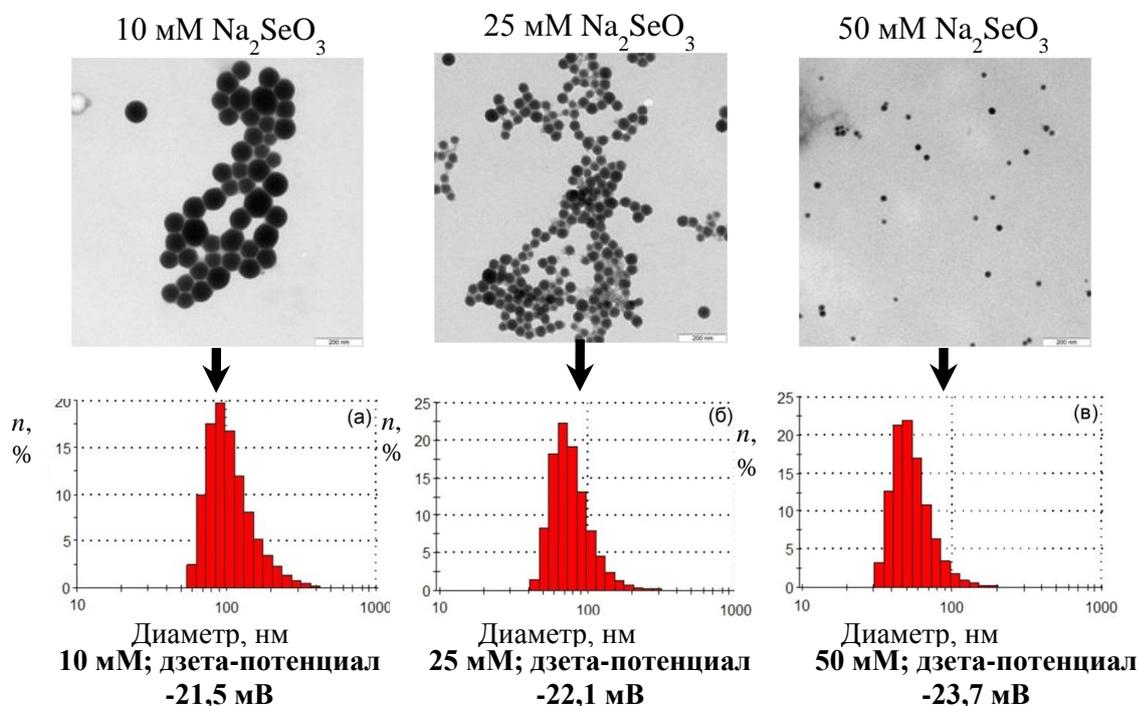
### Получение наночастиц селена с использованием азоспирилл

Существующие в настоящее время методы бактериального синтеза Se-НЧ в большинстве работ предполагают выращивание бактерий в присутствии селенита в течение 2 сут и более (Srivastava & Mukhopadhyay, 2016, Zhang *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2010). Во многих случаях бактерии синтезируют наночастицы внутри клеток, и это было показано ранее для *A. brasilense* Sp7 и Sp245 (Tugarova *et al.*, 2014), что требует дополнительной процедуры разрушения бактериальных клеток при выделении Se-НЧ. Помимо этого, такие Se-НЧ гетерогенны по размеру. При выращивании бактерий параллельно с восстановлением селенита происходят процессы роста и деления бактериальных клеток. Также, наряду с клетками и  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , в среде находятся другие компоненты питательных сред, возможно, оказывающие влияние на восстановление селенит-ионов.

Исходя из всего вышеперечисленного, нами было предложено выращивать бактерии без добавления  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  до поздней логарифмической фазы роста с последующей инкубацией отмытых от компонентов среды клеток в присутствии  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Важной особенностью синтеза Se-НЧ в такой системе являлась их внеклеточная локализация. Это существенно упростило процесс выделения Se-НЧ. Для оптимизации условий синтеза Se-НЧ проведено исследование влияния следующих параметров: (1) концентрации селенита, (2) времени инкубации, (3) pH буферного раствора и (4) плотности культуры бактериальных клеток.

**Концентрация селенит-ионов.** Для подбора условий синтеза Se-НЧ использовали наиболее изученные штаммы *A. brasilense* Sp245 и Sp7, различающиеся по занимаемой экологической нише, и штамм *A. thiophilum* BV-S как наиболее устойчивый к действию селенит-ионов.

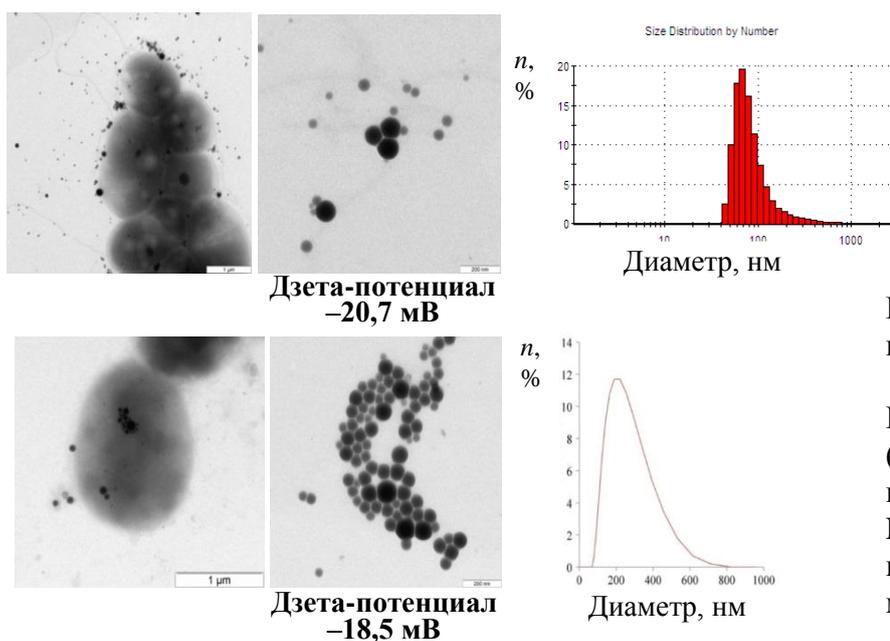
Через 24 ч инкубации клеток *A. brasilense* Sp245 в ФР в присутствии  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  в диапазоне концентраций 10–50 мМ из суспензий были выделены Se-НЧ. По данным ПЭМ (рис. 3), Se-НЧ, полученные с использованием концентрации  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  10 мМ, характеризовались большими размерами по сравнению с Se-НЧ, полученными при концентрациях селенита 25 и 50 мМ, а также большей гомогенностью по размеру. Такие Se-НЧ имели диаметр ~80 нм. Se-НЧ, полученные при инкубации с 25 мМ селенита были более гетерогенными по размеру, их средний диаметр составлял ~47–50 нм; средний диаметр Se-НЧ, полученных при инкубации с 50 мМ селенита ~30 нм. (Следует отметить, что размеры, полученные методом ДРС, были большими, чем определенные с помощью ПЭМ, так как методом ДРС измеряется не истинный, а гидродинамический диаметр Se-НЧ.) Дзета-потенциал Se-НЧ был примерно одинаковым для всех используемых концентраций селенита в диапазоне от –23,7 мВ до –21,5 мВ.



Верхний ряд – микрофотографии ПЭМ (бар – 200 нм); нижний ряд – распределение Se-НЧ по размерам, полученное методом ДРС ( $n$  – доля частиц, %), и их дзета-потенциалы.

Рисунок 3 – наночастицы селена, полученные при инкубации бактерий *A. brasilense* Sp245 в присутствии указанных концентраций  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

Для получения Se-НЧ с помощью *A. brasilense* Sp7 оптимальные концентрации селенита составляли 5 и 10 мМ, для *A. thiophilum* BV-S – 5 мМ. Средний диаметр Se-НЧ, полученных при инкубации *A. brasilense* Sp7 в присутствии 5 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  в течение 24 ч, измеренный с помощью ПЭМ, составлял ~90 нм (рис. 4), дзета-потенциал составлял -20,7 мВ. Средний размер Se-НЧ, полученных с помощью *A. thiophilum* BV-S, измеренный методом ДРС, составлял 50–200 нм, с преобладанием частиц среднего диаметра 200 нм. Дзета-потенциал составлял -18,5 мВ.



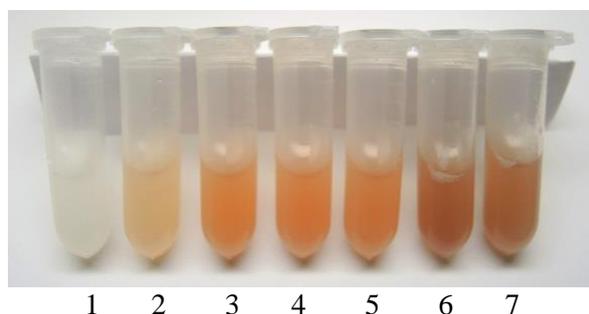
Верхний ряд – *A. brasilense* Sp7; нижний ряд – *A. thiophilum* BV-S.

Рисунок 4 – микрофотографии ПЭМ клеток (бар – 1 мкм) и Se-НЧ (бар – 0,2 мкм), полученных инкубацией бактерий в присутствии 5 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  в течение 24 ч, и распределение по размерам Se-НЧ, полученное методом ДРС ( $n$  – доля частиц, %).

Таким образом, были подобраны оптимальные концентрации селенита для трех штаммов азоспирилл – *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245 и *A. thiophilum* BV-S. Наночастицы были выделены и охарактеризованы методом ДРС; дзета-потенциал Se-НЧ был в диапазоне от  $-18,5$  мВ до  $-23,7$  мВ.

**Влияние pH на образование Se-НЧ.** Были протестированы следующие растворы: буферы по Макилвейну с pH 3–7, а также ФСБ с pH 7,3 и ФР. В экспериментах был использован штамм *A. brasilense* Sp7, инкубированный 24 ч в присутствии 10 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Было зафиксировано изменение окраски клеточных суспензий, инкубируемых в буферах с pH 4,0–7,3 (рис. 5).

Как видно из рис. 5, наиболее интенсивное окрашивание происходило при инкубации в буферах по Макилвейну с pH 5–7. При инкубации в буфере по Макилвейну с pH 3 клетки остались неокрашенными, что свидетельствует об отсутствии восстановленного  $\text{Se}^0$  в суспензии.



1 – буферный раствор по Макилвейну с pH 3; 2 – pH 4, 3 – pH 5, 4 – pH 6; 5 – pH 7; 6 – ФСБ; 7 – ФР.

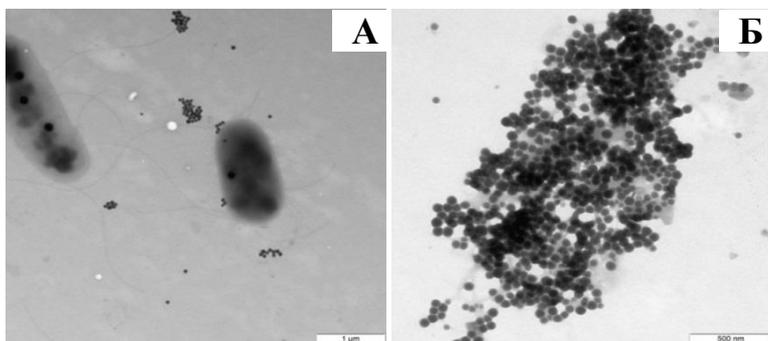
Рисунок 5 – *A. brasilense* Sp7, инкубируемый в течение 24 ч в присутствии 10 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  в буферных растворах с различными значениями pH.

Жизнеспособность клеток проверяли высевом на агаризованную питательную среду. Клетки, инкубированные в буфере по Макилвейну с pH 3, были нежизнеспособны. ПЭМ не показала наличия Se-НЧ в данном варианте опыта; это подтверждает, что к восстановлению  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  способны только живые клетки. При pH 4 бактериальный рост сильно ингибировался. В остальных вариантах культуры оставались жизнеспособными. Из суспензий, инкубированных с селенитом, были выделены Se-НЧ. ПЭМ не показала различий в размерах и однородности по размерам полученных Se-НЧ, поэтому оптимальной средой для синтеза Se-НЧ был выбран ФР, так как он содержит меньшее количество компонентов.

**Плотность бактериальной культуры.** Так как восстановление  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  происходит с помощью ферментативных процессов бактериальных клеток, количество клеток в суспензии было увеличено для более полного восстановления селенита и увеличения количества образуемых Se-НЧ. Оптимальная плотность бактериальной суспензии, определенная экспериментально, составляла  $\sim 16 \times 10^9$  кл./мл.

### Получение Se-НЧ с использованием других бактерий

Выявленные закономерности были использованы для синтеза Se-НЧ с помощью *E. coli* K-12. Изображения полученных Se-НЧ (24 ч, 1 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) представлены на рис. 6. В других публикациях для очистки Se-НЧ с использованием *E. coli* предлагаются более сложные способы (Xia *et al.*, 2018, Medina Cruz *et al.*, 2018).



А – Микрофотографии ПЭМ клеток *E. coli* К-12, инкубированных в течение 24 в присутствии 1 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (бар – 1 мкм); Б – очищенных Se-НЧ (бар – 500 нм).

Рисунок 6 – Se-НЧ, синтезированные с использованием *E. coli* К-12.

Полученные результаты показывают, что разработанный метод синтеза экстраклеточных Se-НЧ азоспириллами может быть использован также для других бактерий. Дальнейшей задачей было отделение Se-НЧ от бактериальных клеток.

### Выделение Se-НЧ

Экстраклеточная локализация Se-НЧ значительно облегчила их выделение; оно включало осаждение клеток центрифугированием и фильтрованием надосадка через микронные фильтры ( $\varnothing$  пор 0,22 или 0,45 мкм). Режим центрифугирования подбирался индивидуально для каждого штамма азоспирилл. Для фильтрации наилучшими фильтрами были фильтры из материалов с низким связыванием белков (ПВДФ или ПЭС). Связывание белков фильтрами с мембраной из ЦА (Mahler *et al.*, 2010) способствовало сорбции Se-НЧ на мембране фильтра.

Таким образом, нами разработан метод синтеза Se-НЧ, включающий несколько основных этапов: (1) культивирование бактерий; (2) сбор и отмывка выросшей культуры; (3) инкубация с  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; (4) очистка и концентрирование Se-НЧ.

Описанный в данной работе метод позволяет сократить время синтеза Se-НЧ до 24 ч или менее, а также сократить время очистки Se-НЧ, исключая стадию разрушения бактериальных клеток. Используемый для синтеза Se-НЧ раствор (ФР) прост в приготовлении и не требует дополнительных компонентов. Показана возможность применения полученной методики для синтеза Se-НЧ с использованием грамотрицательных бактерий другого рода.

### Исследование наночастиц, полученных с помощью бактерий рода *Azospirillum*, методами колебательной спектроскопии

*Характеристика Se-НЧ, полученных с помощью бактерий рода *Azospirillum*, с помощью ИК-фурье-спектроскопии.* Наночастицы, синтезированные с помощью бактерий, обычно содержат ассоциированные с их поверхностью биологические макромолекулы (Debieux *et al.*, 2011; Lampis *et al.*, 2017; Mollania *et al.*, 2016). Метод ИКФС позволяет выявлять наличие биологических макромолекул в составе Se-НЧ (Tugarova & Kamnev, 2017). С помощью ИКФС были исследованы Se-НЧ, синтезированные с помощью штаммов *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S. В ИК-спектрах были соотнесены основные полосы с соответствующими функциональными группами, содержащимися в биомacroмолекулах (таблица 1). В первую очередь это типичные полосы, соответствующие белковым компонентам:

1) амид-I: для образца (1) при  $1644 \text{ см}^{-1}$ , что соответствует неупорядоченной вторичной структуре белка, и для образца (2) –  $1656 \text{ см}^{-1}$  и  $1635 \text{ см}^{-1}$ , соответствующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -структурам, соответственно;

2) амид-II (при  $1540 \text{ см}^{-1}$ , полностью перекрытая для образца (1) и частично – для (2));

3) амид-III (около  $1253 \text{ см}^{-1}$ ).

Типичная полоса белков (пептидной связи) амид-II (при  $1540\text{ см}^{-1}$ ) присутствует для образца (2); для образца (1) она перекрывается интенсивной полосой валентных антисимметричных колебаний карбоксильной связи ( $\text{COO}^-$ ) в области  $1565\text{ см}^{-1}$ . Присутствие карбоксильных групп также подтверждается для обоих образцов наличием валентных симметричных колебаний  $\nu_s(\text{COO}^-)$  при  $1411$  и  $1392\text{ см}^{-1}$  (таблица 1). Наличие карбоксильных групп обеспечивает стабильность водных суспензий биогенных Se-НЧ, придавая их поверхности заряд (Jain *et al.*, 2015). Это подтверждается отрицательным дзета-потенциалом биологически синтезированных Se-НЧ в нейтральных растворах, также отмеченным в литературе (Jain *et al.*, 2015; Mollania *et al.*, 2016). Дзета-потенциал изучаемых Se-НЧ, синтезированных в данной работе, составлял минус (18–24) мВ. По данным ИКФС, количество остатков  $\text{COO}^-$  снижается с увеличением числа отмывок. Таким образом, карбоксилат-содержащие компоненты, наиболее вероятно, относительно слабо связаны с поверхностью Se-НЧ, в отличие от биомакромолекулярной оболочки, которая остается стабильной.

Типичная область колебаний полисахаридов ( $1200\text{--}950\text{ см}^{-1}$ ) на спектрах также характеризуется заметным поглощением, соответствующим колебаниям групп C–O/C–C, C–O–H или C–O–C. Все это свидетельствует о присутствии белков и полисахаридов в биомакромолекулярном слое, адсорбированном на поверхности Se-НЧ.

На присутствие липидов (включая алифатические цепи остатков жирных кислот) в слое, связанном с Se-НЧ, указывает появлением полос, соответствующих колебаниям  $\nu(\text{C}=\text{O})$  сложноэфирных групп, характерных для липидов, при  $1741$  и  $1739\text{ см}^{-1}$  для образцов Se-НЧ (таблица 1). В литературе было показано, что липиды могут присутствовать в биомакромолекулярном слое на поверхности Se-НЧ, синтезированных бактериями (Gonzalez-Gil *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2018).

Таблица 1 – Соотнесение основных полос с функциональными группами в исследуемых образцах (волновые числа,  $\text{см}^{-1}$ )

Функциональная группа	Se-НЧ, полученные с помощью <i>A. brasilense</i> Sp7	Se-НЧ, полученные с помощью <i>A. thiophilum</i> BV-S
C=O (сложноэфирная связь), $\nu$	1741 (сл.)	1739 (сл.)
Амид-I (в белках)	1644	1656, 1635
Карбоксил $\text{COO}^-$ , $\nu_{\text{as}}$	1565 (с.)	пер.
Амид-II (в белках)	пер.	1542
–CH <sub>3</sub> , $\delta$ (в белках, липидах, полиэфирах и др.)	п.	1451
$\text{COO}^-$ , $\nu_s$	1411	1392
Амид-III/ O–P=O $\nu_{\text{as}}$	1253	1244, 1228 (сл.)
C–O, C–C $\nu$ , C–O–H, C–O–C $\delta$ (в полисахаридах и полиэфирах)	1081	1126, 1067, 1047

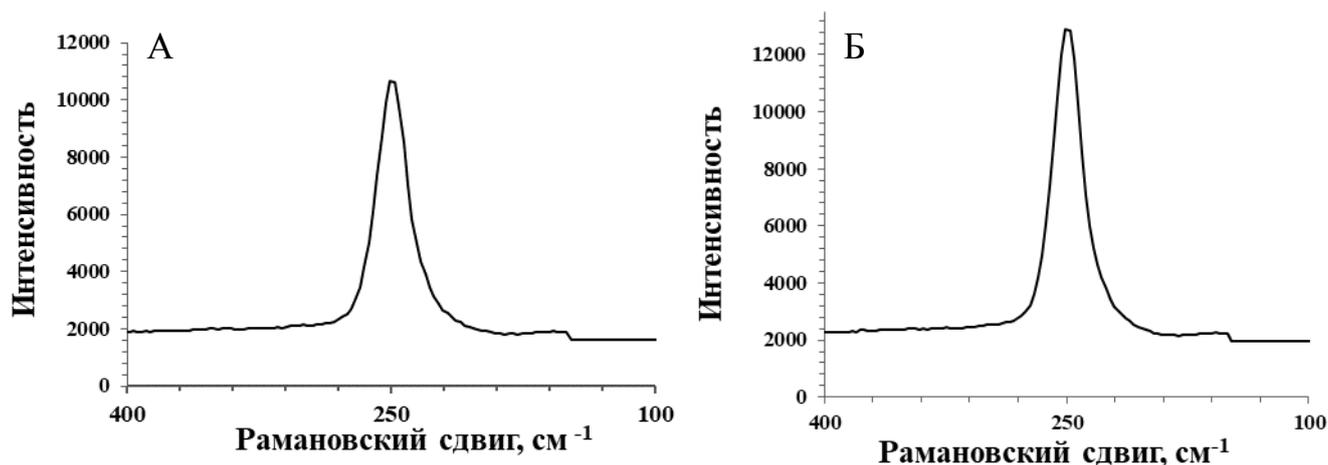
Обозначения:  $\nu$  – валентные колебания;  $\nu_s$  – симметричные валентные колебания;  $\nu_{\text{as}}$  – антисимметричные валентные колебания;  $\delta$  – деформационные колебания; п. – плечо; с. – сильная; сл. – слабая; пер. – полоса перекрыта более сильной соседней.

Таким образом, методом ИКФС показано, что в состав биомакромолекулярного слоя, ассоциированного с поверхностью Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S, входят белки, полисахариды и липиды.

*Характеристика наночастиц, полученных с помощью бактерий рода Azospirillum, методом спектроскопии комбинационного рассеяния.* Спектроскопия КР чувствительна к структурным различиям аллотропных модификаций селена (Lucovsky

*et al.*, 1967; Van Overschelde & Guisbiers, 2015), что используется для исследования наноматериалов, состоящих из селена.

В низкочастотной области КР-спектров Se-НЧ, синтезированных с использованием *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S, наблюдался один пик с максимумом при  $250\text{ см}^{-1}$ , соответствующий колебаниям связи Se-Se (рис. 7). Положение пика, а также его увеличенная ширина (примерно  $30\text{ см}^{-1}$  на половине интенсивности) соответствуют аморфной модификации Se (Lucovsky *et al.* 1967; Van Overschelde & Guisbiers, 2015; Kora & Rastogi, 2016).



А – *A. brasilense* Sp7; Б – *A. thiophilum* BV-S.

Рисунок 7 – спектры КР Se-НЧ, полученных при инкубации бактерий рода *Azospirillum* в присутствии  $5\text{ мМ Na}_2\text{SeO}_3$  в течение 24 ч.

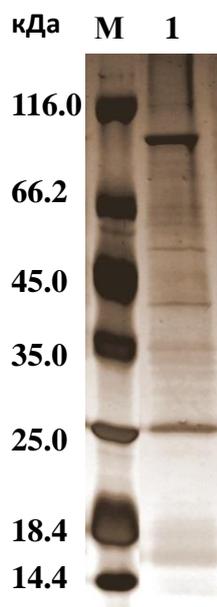
Таким образом, селен в составе Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S, находится в аморфной модификации.

### Электрофоретическое и иммунохимическое исследование

#### биомакромолекулярного слоя Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7

Для изучения биомакромолекул, ассоциированных с Se-НЧ, они были отделены от Se-НЧ с использованием детергентов и ультразвуковой обработки. Денатурирующий электрофорез белковой составляющей, ассоциированной с Se-НЧ, показал наличие доминирующей полосы белка массой  $96\text{ кДа}$  и менее интенсивной –  $25\text{ кДа}$  (рис. 8). Мы предполагаем, что эти белки принимают участие в сборке Se-НЧ у бактерий рода *Azospirillum* и обеспечивают стабильность водных суспензий образующихся Se-НЧ.

Иммунохимический анализ Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7, и биополимеров, выделенных с их поверхности, был проведен в двух вариантах: дот-блот-анализ и иммуноферментный анализ. Установлено, что в состав биополимеров, экстрагированных с поверхности Se-НЧ, входят вещества, содержащие антигенные детерминанты поверхности клеток штамма *A. brasilense* Sp7. По сравнительному уровню взаимодействия с различными антителами можно констатировать, что в состав биополимеров входят соединения, содержащие эпитопы как углеводных, так и белковых антигенов. Флагеллин *A. brasilense* Sp7 в составе белков, ассоциированных с поверхностью Se-НЧ, присутствует, но не доминирует среди белковых антигенов.



М – маркеры; 1 – белки, ассоциированные с поверхностью Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7.

Рисунок 8 – Электрофоретические профили белковой составляющей, выделенной с поверхности Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7. (Окрашивание серебром.)

Таким образом, в составе биомакромолекулярного слоя, связанного с поверхностью Se-НЧ, присутствуют белки и гликополимеры поверхности бактериальных клеток, а также флагеллин. Это может свидетельствовать о том, что внеклеточная сборка Se-НЧ у азоспирилл может происходить с участием белков поверхности бактериальных клеток.

#### **Влияние Se-НЧ, полученных с помощью штаммов *A. thiophilum* BV-S и *A. brasilense* Sp7, на метаболическую активность клеток культуры HeLa**

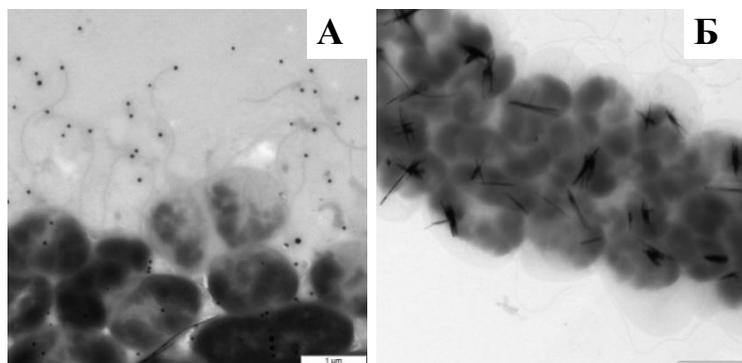
Элементарный селен в форме наночастиц привлекает внимание своей высокой биологической активностью и малой токсичностью (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2011). В рамках данной работы был проведен анализ метаболической активности клеток карциномы шейки матки человека (HeLa) при росте в присутствии Se-НЧ, полученных с помощью бактерий рода *Azospirillum*. Исследование выявило токсическое действие препаратов Se-НЧ, полученных с помощью обоих используемых штаммов. Se-НЧ в концентрации 0,218 мкг/мл, полученные с использованием *A. brasilense* Sp7, и Se-НЧ в концентрации 0,115 мкг/мл, полученные с использованием *A. thiophilum* BV-S, угнетают метаболическую активность клеток культуры HeLa на 46% и 28%, соответственно, что может быть использовано для разработки методов терапии раковых заболеваний.

#### **Изучение механизмов восстановления $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ азоспириллами**

Механизмы восстановления селенит-ионов бактериями многообразны. Восстановление может происходить с помощью тиоловых групп белков и пептидов, различных редуктаз, таких как нитрит- и нитратредуктазы, и др. Ранее для *A. brasilense* Sp245 и Sp7 (Tugarova *et al.*, 2014) были представлены данные, свидетельствующие о внутриклеточном восстановлении селенит-ионов данными бактериями в процессе роста.

*Протон-зависимый транспорт.* Как видно на микрофотографиях ПЭМ, восстановление селенит-ионов клетками штамма *A. brasilense* Sp245 после обработки КЦХФ происходило без образования Se-НЧ, при этом наблюдались многочисленные включения игловидных кристаллов  $\text{Se}^0$  внутри клеток (рис. 9Б), в отличие от восстановления селенита без обработки КЦХФ (рис. 9А). Для штамма *A. brasilense* Sp7 были получены аналогичные результаты.

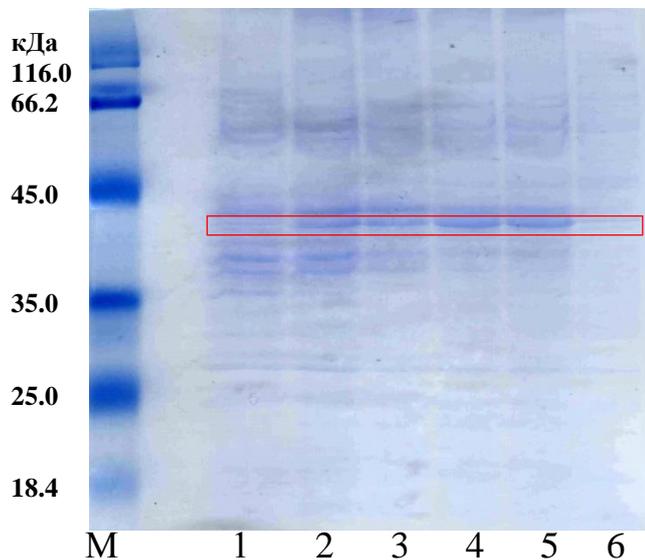
Полученные результаты дают основания полагать, что в процесс поглощения селенита клетками изученных штаммов протон-зависимый транспорт не включается, восстановление ионов  $\text{SeO}_3^{2-}$  происходит в цитоплазме или периплазматическом пространстве, а сборка Se-НЧ происходит, вероятно, вне бактериальных клеток. Вынос же зародышей Se-НЧ происходит с участием протон-зависимого транспорта, т.к. при его блокировании КЦХФ  $\text{Se}^0$  скапливается внутри клеток в виде кристаллов.



А – клетки без обработки КЦХФ; Б – клетки, обработанные 10 мкМ КЦХФ; бар – 1 мкм.

Рисунок 9 – Клетки *A. brasilense* Sp245, инкубированные в течение 24 ч в присутствии 10 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

*Индукция синтеза белков клеточной поверхности бактерий и периплазмы в присутствии селенита.* Нами была показана индукция синтеза белков клеточной поверхности и периплазмы у *A. brasilense* Sp245 при росте в присутствии селенита. Бактерии выращивали при добавлении в среду  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  в диапазоне концентраций 0,05–5 мМ в течение 7 сут. На белковых профилях бактерий, выращенных в присутствии  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , с увеличением концентрации селенита вплоть до 1 мМ наблюдается усиление полосы в области ~ 41 кДа, отсутствующей на профиле контрольной культуры (рис. 10).



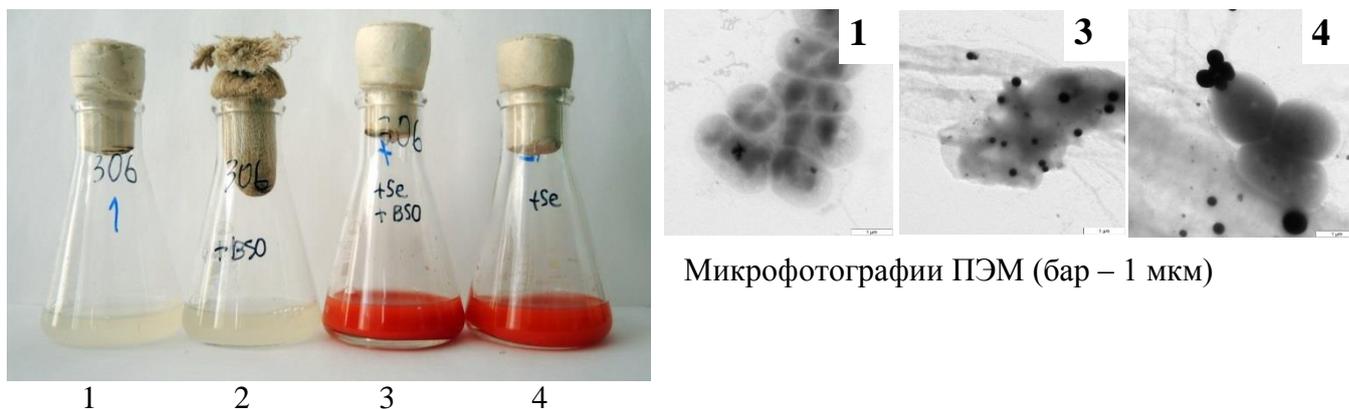
М – маркеры, 1 – клетки без  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; 2 – 0,05 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; 3 – 0,1 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; 4 – 0,5 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; 5 – 1 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; 6 – 5 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

Рисунок 10 – Электрофоретический профиль белков периплазмы и клеточной поверхности *A. brasilense* Sp7 (рост 7 сут).

Таким образом, восстановление селенит-ионов у азоспирилл сопровождается индукцией синтеза периплазматического белка или белка внешней мембраны клетки, играющего роль в переносе зародышей Se-НЧ из клетки или непосредственно в самом восстановлении.

*Редокс-система глутатиона.* Основным механизмом защиты от селенит-ионов у бактерий считаются реакции с соединениями, содержащими тиоловые группы (Painter, 1941). Для определения роли редокс-системы глутатиона используют БСО, ингибитор  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы, ключевого фермента синтеза глутатиона. Для бактерий *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02 (Blake *et al.*, 1993; Antonioli *et al.*, 2007) и

*Rhodospirillum rubrum* (Kessi, 2006) было показано заметное ингибирование роста в присутствии селенита и БСО по сравнению с ростом в отсутствие последнего, что указывает на участие глутатиона в восстановлении селенита. По результатам проведенных нами экспериментов, существенных различий в бактериальном росте между культурой *A. brasilense* Sp7, культивируемой в присутствии селенита и БСО, и культурой, содержащей только селенит, обнаружено не было. Динамика роста и интенсивность окрашивания суспензий не отличались у бактериальных суспензий, выращиваемых в присутствии только селенита и в присутствии селенита и БСО (рис. 11). Результаты ПЭМ для исследуемых бактериальных культур на 6 сут показали наличие Se-НЧ в обоих вариантах (рис. 11). Таким образом, присутствие БСО в среде не влияет на восстановление селенит-ионов у *A. brasiliense* Sp7. Аналогичные контрольным (без селенита и БСО) результаты были получены при инкубации бактериальных клеток в присутствии БСО.



Микрофотографии ПЭМ (бар – 1 мкм)

1 – контроль, культура без добавления БСО и  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 2 – в присутствии 2 мМ БСО, 3 – в присутствии 2 мМ БСО и 2 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 4 – в присутствии 2 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

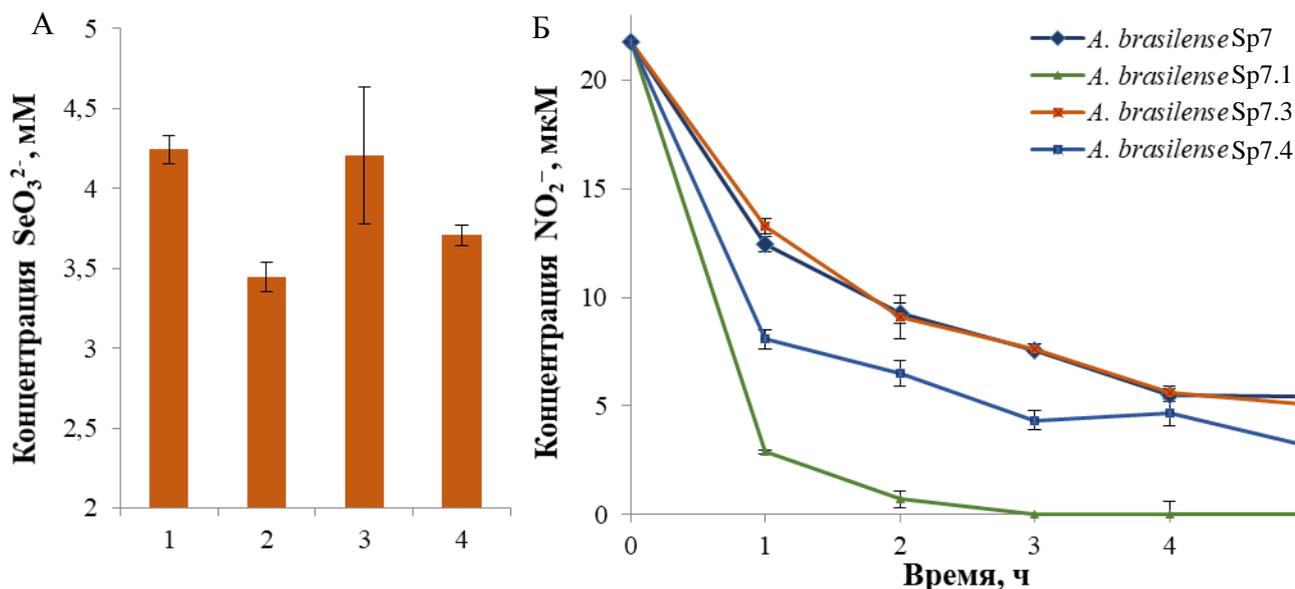
Рисунок 11 – Восстановление  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  культурой *A. brasilense* Sp7 в присутствии БСО на 6-е сут роста.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что включение глутатиона в восстановление селенит-ионов не является основным путем их детоксификации у *A. brasilense* Sp7.

**Система денитрификации.** По литературным данным, в процесс восстановления селенита могут включаться нитрит- и нитратредуктазы (Hunter & Manter, 2008; DeMoll-Decker & Masy, 1993; Hunter *et al.*, 2007; Hunter & Kuyendall, 2007). Азоспириллы имеют способность к денитрификации (Bashan *et al.*, 2004). Нами было предположено, что система денитрификации может быть включена в процесс восстановления селенит-ионов азоспириллами.

Для проверки данной гипотезы были проведены исследования с использованием производных штамма *A. brasilense* Sp7, имеющих различия в скорости нитритредукции (Петрова с соавт., 2005): *A. brasilense* Sp7.1 (максимальная), *A. brasilense* Sp7.4 (промежуточная), *A. brasilense* Sp7.3 (минимальная, сопоставимая со скоростью для *A. brasilense* Sp7). Выращенные до поздней логарифмической стадии, отмытые и сконцентрированные бактериальные клетки штамма *A. brasilense* Sp7 и его производных инкубировали с 5 мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Скорость восстановления контролировали по изменению интенсивности красного окрашивания и в конце инкубирования определяли остаточную концентрацию селенит-ионов. Наименьшая остаточная концентрация селенит-ионов в надосадке была в случае производного с максимальной скоростью нитритредукции (*A. brasilense* Sp7.1); соответственно,

наибольшая – с минимальной (*A. brasilense* Sp7.3; то же у *A. brasilense* Sp7; рис. 12). Полученные результаты свидетельствуют о том, что восстановление селенит-ионов у азоспирилл происходит с участием процессов денитрификации.



А – Концентрация SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> в надосадке после 24 ч инкубации *A. brasilense* Sp7 и его производных в присутствии 5 мМ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>; 1– *A. brasilense* Sp7; 2 – *A. brasilense* Sp7.1; 3 – *A. brasilense* Sp7.3; 4 – *A. brasilense* Sp7.4; Б – Восстановление нитрит-ионов *A. brasilense* Sp7 и его производными.

Рисунок 12 – Корреляция скорости восстановления селенит- и нитрит-ионов штаммом *A. brasilense* Sp7 и его производными.

Таким образом, на основании полученных данных предполагается, что процесс восстановления селенит-ионов у азоспирилл при инкубации в присутствии Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> включает следующие стадии: (1) транспорт селенит-ионов внутрь бактериальных клеток; (2) внутриклеточное восстановление, происходящее через включение селенит-ионов в систему денитрификации; (3) вынос зародышей Se-НЧ из бактериальных клеток посредством протон-зависимого транспорта; (4) внеклеточная сборка Se-НЧ вблизи поверхности клеток с участием биологических макромолекул.

## ВЫВОДЫ

1. Все исследованные виды азоспирилл (*A. lipoferum*, *A. halopraeferens*, *A. thiophilum*, *A. zaeae*, *A. formosense*, *A. palatum*, *A. picis*) способны к восстановлению селенита с образованием Se-НЧ. Для всех указанных видов наблюдалось удлинение лаг-фазы бактериального роста. Самым чувствительным к селениту является *A. halopraeferens* Au4: максимальная концентрация, при которой наблюдался рост и восстановление селенит-ионов, составила 0,1 мМ; наиболее устойчивым – *A. thiophilum* BV-S: рост и восстановление селенита наблюдались до 15 мМ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.

2. Разработана оригинальная методика синтеза Se-НЧ с использованием бактерий вида *A. brasilense*, позволяющая получить Se-НЧ с экстраклеточной локализацией. Подобраны оптимальные условия (концентрации Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, время инкубации, плотность культуры, pH среды) для синтеза Se-НЧ. Размер и однородность Se-НЧ зависели от концентрации селенита в среде. Оптимальная концентрация Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> в среде для *A. brasilense* Sp245 составляла 10 мМ, для *A. brasilense* Sp7 – 5 и 10 мМ, для *A. thiophilum* BV-S – 5 мМ. Показана универсальность разработанной методики для получения Se-НЧ с использованием других бактерий.

3. Полученные с помощью *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S Se-НЧ охарактеризованы с использованием методов колебательной спектроскопии, ПЭМ, ДРС и иммунохимии. Суспензии Se-НЧ имеют дзета-потенциал от  $-18,5$  до  $-23,7$  мВ. Se<sup>0</sup> в составе наночастиц находится в аморфной модификации. Se-НЧ содержат белки, полисахариды и липиды. В составе биополимеров, выделенных с поверхности Se-НЧ, имеются как белковые, так и полисахаридные антигенные детерминанты, соответствующие таковым на поверхности бактериальных клеток *A. brasilense* Sp7 и Sp245. Методом денатурирующего ПААГ-электрофореза показано наличие доминирующей полосы массой 96 кДа и менее интенсивной – 25 кДа в белковой составляющей Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7.

4. Se-НЧ в концентрации 0,218 мкг/мл, полученные с использованием *A. brasilense* Sp7, и Se-НЧ в концентрации 0,115 мкг/мл, полученные с использованием *A. thiophilum* BV-S, угнетают метаболическую активность клеток культуры HeLa на 46% и 28%, соответственно, что может быть использовано для разработки методов терапии раковых заболеваний.

5. С использованием ингибитора протонной помпы КЦХФ показано, что вынос зародышей Se-НЧ из клетки проходит с участием протон-зависимого транспорта, при этом для транспорта селенит-ионов в клетку не требуется энергия. Сборка Se-НЧ происходит во внеклеточном пространстве с участием биомакромолекул. Установлена прямая корреляция между процессами восстановления селенит-ионов и нитрит-ионов. Не выявлено различий в восстановлении селенит-ионов при ингибировании синтеза глутатиона у *A. brasilense* Sp7, что свидетельствует о несущественной роли редокс-системы глутатиона в восстановлении SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> у азоспирилл.

### РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

1. Штамм *A. thiophilum* BV-S, отличающийся устойчивостью к селениту, может быть использован в биоремедиации загрязненных селеном земель и водоемов.

2. Разработанная схема получения Se-НЧ рекомендуется для синтеза биогенных Se-НЧ с использованием бактерий.

3. Наночастицы селена, полученные с помощью бактерий рода *Azospirillum*, могут быть использованы для разработки методов терапии онкологических заболеваний.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БСО	–	бутионинсульфоксимин
ДРС	–	динамическое рассеяние света
ДСН	–	додecilсульфат натрия
ИКФС	–	инфракрасная фурье-спектроскопия
КР	–	комбинационное рассеяние
КЦХФ	–	карбонилцианид- <i>m</i> -хлорофенилгидразон
ОП	–	оптическая плотность
ПВДФ	–	поливинилиденфторид
ПЭМ	–	просвечивающая электронная микроскопия
ПЭС	–	полиэфирсульфон
СМС	–	синтетическая малатная среда
ФР	–	физиологический раствор (0,85% водный хлорид натрия)
ФСБ	–	фосфатно-солевой буфер
ЦА	–	ацетат целлюлозы
HeLa	–	клетки карциномы шейки матки человека
Se-НЧ	–	наночастицы селена

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований:

1. Tugarova, A.V. FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum* / A.V. Tugarova, **P.V. Mamchenkova**, Yu.A. Dyatlova, A.A. Kamnev // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2018. – Vol. 192. – P. 458–463. Web of Sci.: IF = 2,931; Q1; цит. 7 (Scopus).

2. Tugarova, A.V. Biochemical study of selenite bioconversion by *Azospirillum brasilense* / A.V. Tugarova, **P.V. Mamchenkova**, Y.A. Dyatlova, A.A. Kamnev // *FEBS Open Bio.* – 2018. – Vol. 8. – Suppl. 1. – P. 479–480. Web of Sci.: IF = 1,959; Q4.

3. Tugarova, A.A. Bacteria as cell factories for producing selenium nanoparticles: their synthesis by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* and characterization / A.A. Tugarova, **P.V. Mamchenkova**, Y.A. Dyatlova, A.A. Kamnev // *New Biotechnol.* – 2018. – Vol. 44S. – P. S18. Web of Sci.: IF = 3,739; Q1.

4. Kamnev, A.A. FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles / A.A. Kamnev, **P.V. Mamchenkova**, Yu.A. Dyatlova, A.V. Tugarova // *J. Mol. Struct.* – 2017. – Vol. 1140. – P. 106–112. Web of Sci.: IF = 2,120; Q3; цит. 13 (Scopus).

### Публикации в российских и международных сборниках трудов и материалов научных конференций:

1. Тугарова, А.В. Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* с образованием селеновых наночастиц / А.В. Тугарова, **П.В. Мамченкова**, А.А. Камнев // 2-й Российский микробиологический конгресс, 23–27 сентября 2019 г., Саранск. Матер. конгресса. – С. 65.

2. Тугарова, А.В. Изучение наночастиц селена, синтезируемых ризобактерией *Azospirillum brasilense* Sp7, методами колебательной спектроскопии / А.В. Тугарова, **П.В. Мамченкова**, Ю.А. Дятлова, А.А. Камнев // Международная научная конференция «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC 2018: тезисы, Уфа, 13–17 июня 2018 г. – Уфа: АНО Центр поддержки академических инициатив, 2018. – С. 238.

3. **Мамченкова, П.В.** Использование биомассы бактерий рода *Azospirillum* для получения наночастиц Se(0) / П.В. Мамченкова, Ю.А. Дятлова, А.В. Тугарова, А.А. Камнев // Второй междисциплинарный молодежный научный форум с международным участием «Новые материалы»: сборник материалов, Москва, 21–24 ноября 2017 г. – М: ООО «Буки Веди», 2017. – С. 850–852.

4. Тугарова, А.В. “Зеленый синтез” селеновых наночастиц ризобактериями *Azospirillum brasilense*: механизмы бактериального восстановления селенит-ионов / А.В. Тугарова, **П.В. Мамченкова**, А.А. Камнев // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты / Годичное собрание ОФР, науч. конф. и школа для мол. уч., 18–24 сент. 2017 г., Судак: сб. мат. докл. – Изд-во АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. – С. 67.

5. **Мамченкова, П.В.** Влияние ингибитора протонной помпы карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразона (СССР) на восстановление селенита бактерией *Azospirillum brasilense* Sp7 / П.В. Мамченкова, А.А. Камнев, А.В. Тугарова // 1-й Российский микробиологический конгресс: сборник тезисов / под ред. д.б.н. Решетиловой Т.А. – Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017. – С. 113–114.

6. Tugarova, A.V. FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thioophilum* / A.V. Tugarova, **P.V. Mamchenkova**, Yu.A. Dyatlova, A.A. Kamnev // Colloquium Spectroscopicum Internationale XL, Pisa, Italy, 11<sup>th</sup>–16<sup>th</sup> of June 2017. – Book of Abstr. – Abstr. PP62. – P. 420.

7. Tugarova, A.V. A simple method of bacterial synthesis of extracellular selenium nanoparticles by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* / A.V. Tugarova, **P.V. Mamchenkova**, Yu.A. Dyatlova, A.A. Kamnev // 2nd Caparica Christmas Conference on Sample Treatment, 5–7 Dec. 2016, Caparica, Portugal. Book of Abstr. – Abstr. P 24. – P. 188.

8. Kamnev, A.A. Spectroscopic studies of selenite reduction by bacterial cells and the formation of selenium nanoparticles / A.A. Kamnev, **P.V. Mamchenkova**, Yu.A. Dyatlova, A.V. Tugarova // 33rd European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS 2016), 30 July – 4 Aug. 2016, Szeged, Hungary. Programme & Book of Abstracts. Budapest: Hung. Chem. Soc., 2016. – Abstr. O7. – P. 43.

9. Tugarova, A.V. Transformation of selenite by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles / A.V. Tugarova, **P.V. Mamchenkova**, A.A. Kamnev // Proceeding of The International Conference on Biochemistry and Molecular Biology, Venice, Italy, Apr. 27–29, 2016. – P. 37.

10. **Мамченкова, П.В.** Биосинтез наночастиц селена ризобактерией *Azospirillum brasilense* / П.В. Мамченкова, А.А. Камнев, А.В. Тугарова // Всероссийская молодежная научная конференция с международным участием «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов»: материалы, Томск, 26–28 апреля 2016 г. – Томск: Изд-во Дом Томск. гос. ун-та, 2016. – С. 22–25.

11. **Мамченкова, П.В.** Изучение восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* / П.В. Мамченкова, А.А. Камнев, А.В. Тугарова // XIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук»: сб. науч. тр., Томск, 26–29 апреля 2016 г. – Томск: Изд-во Томск. пол. ун-т, 2016. – С. 66–68.

12. **Мамченкова, П.В.** Некоторые аспекты восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* / П.В. Мамченкова, А.А. Камнев, А.В. Тугарова // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой / VIII Всероссийская конференция молодых ученых, Саратов, 26–30 сентября 2016 г. – Саратов, 2016. – С. 63.

13. **Мамченкова, П.В.** Синтез наночастиц селена бактерией *Azospirillum brasilense* Sp245 и их выделение / П.В. Мамченкова, А.В. Тугарова // XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: Сб. тез. докл. – Москва: Изд-во ИБХ РАН, 2015. – С. 28.

14. Tugarova, A.V. Synthesis of selenium nanoparticles by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* and their characterization / A.V. Tugarova, **P.V. Mamchenkova**, A.A. Kamnev // Proceeding of The 5th International Selenium Seminar “Selenium: Biology, Clinical and Preventive Medicine, Nutrition”. Moscow–Yaroslavl, Sept. 21–25, 2015. – Moscow–Yaroslavl, 2015. – P. 78–79.

15. **Мамченкова, П.В.** Сравнение токсичности селенита натрия для штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и его мутанта Sp245.5 / П.В. Мамченкова // Исследования молодых ученых и студентов в биологии и экологии: Сб. науч. тр. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2013. – Вып. 11 – С. 62–66.