

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И
МИКРООРГАНИЗМОВ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

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)

Научные руководители:

кандидат биологических наук

Тугарова Анна Владимировна,

доктор химических наук, профессор

Камнев Александр Анатольевич

Саратов – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Значение селена для биологических объектов.....	11
1.1.1 Селен как микроэлемент.....	12
1.1.2 Токсичность соединений селена.....	15
1.1.3 Биогеохимический цикл селена.....	17
1.2 Метаболизм селена у бактерий.....	21
1.2.1 Транспорт селенатов и селенитов в клетку.....	22
1.2.2 Механизмы трансформации оксоанионов селена.....	23
1.2.2.1 Ассимиляция.....	25
1.2.2.2 Диссимиляция.....	26
1.2.2.3 Детоксификация.....	32
1.3 Использование потенциала селенит-восстанавливающих бактерий в бионанотехнологии.....	37
1.4 Влияние оксоанионов селена на <i>Azospirillum brasilense</i>	44
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
2.1 Объекты исследования.....	48
2.2 Среды для культивирования бактерий.....	49
2.3 Методы исследования.....	50
2.3.1 Определение токсичности и восстановления селенита натрия.....	50
2.3.2 Восстановление селенит-ионов производными штамма <i>A. brasilense</i> Sp7, различающимися по скорости нитритредукции.....	50
2.3.3 Ингибирование протондвижущей силы.....	51
2.3.4 Ингибирование синтеза глутатиона.....	52
2.3.5 Получение наночастиц селена с использованием бактерий рода <i>Azospirillum</i>	53
2.3.6 Выделение белков клеточной поверхности, внешней мембраны и периплазмы.....	54
2.3.7 Выделение белков с поверхности наночастиц селена.....	55
2.3.8 Электрофорез в полиакриламидном геле.....	55
2.3.9 Иммунохимическое исследование.....	56
2.3.10 Определение концентрации селенит-ионов.....	57
2.3.11 Динамическое рассеяние света и измерение дзета-потенциала.....	57
2.3.12 ИК-фурье-спектроскопия.....	58
2.3.13 Спектроскопия комбинационного рассеяния.....	58
2.3.14 Атомно-абсорбционная спектрометрия.....	59
2.3.15 Просвечивающая электронная микроскопия.....	59

2.3.16	Определение цитотоксичности суспензий наночастиц селена по дыхательной активности на клетках HeLa.....	60
2.3.17	Статистическая обработка полученных результатов.....	60
3	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	61
3.1	Влияние селенит-ионов на рост бактерий рода <i>Azospirillum</i> и определение их способности к образованию наночастиц селена.....	61
3.2	Получение наночастиц селена с использованием азоспирилл.....	69
3.2.1	Определение оптимальных концентраций селенита.....	70
3.2.2	Динамика образования наночастиц селена.....	73
3.2.3	Влияние pH на образование наночастиц селена.....	74
3.2.4	Плотность бактериальной культуры.....	76
3.2.5	Получение наночастиц селена с использованием других бактерий.....	77
3.2.6	Выделение наночастиц селена.....	80
3.3	Исследование наночастиц, полученных с помощью бактерий рода <i>Azospirillum</i> , методами колебательной спектроскопии.....	82
3.3.1	ИК-спектроскопическая характеристика наночастиц селена.....	82
3.3.2	Характеристика наночастиц селена с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния.....	88
3.4	Электрофоретическое исследование белковой составляющей наночастиц селена, полученных с помощью <i>A. brasilense</i> Sp7.....	90
3.5	Иммунохимический анализ биополимеров, выделенных с поверхности наночастиц селена, полученных с помощью <i>A. brasilense</i> Sp7 и <i>A. thiophilum</i> BV-S.....	92
3.6	Влияние наночастиц селена, полученных с помощью штаммов <i>A. thiophilum</i> BV-S и <i>A. brasilense</i> Sp7, на метаболическую активность клеток культуры HeLa.....	95
3.7	Изучение механизмов восстановления Na_2SeO_3 азоспириллами.....	97
3.7.1	Протонзависимый транспорт.....	98
3.7.2	Индукция белков клеточной поверхности бактерий и периплазмы в присутствии селенита.....	101
3.7.3	Редокс-система глутатиона.....	102
3.7.4	Система денитрификации.....	105
	ВЫВОДЫ.....	110
	БЛАГОДАРНОСТИ.....	112
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	113
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	114
	СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	142

ВВЕДЕНИЕ

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 (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 наночастиц селена (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 (Nancharaiyah & Lens, 2015). В восстановлении селенитов у бактерий, скорее всего, одновременно участвуют несколько биохимических путей. Бактериальное восстановление селенатов, содержащих Se в степени

окисления +6 (SeO_4^{2-}), встречается гораздо реже, чем селенитов (степень окисления +4; SeO_3^{2-}). В частности, для бактерии *Azospirillum 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 века (Macy *et al.*, 1989; Oremland *et al.*, 1989). Механизмы, лежащие в основе такого восстановления, изучены для некоторых микроорганизмов, в основном, анаэробов, использующих селенаты для анаэробного дыхания (Macy *et al.*, 1993; Oremland *et al.*, 1994; Stolz & Oremland, 1999; Nancharaiah & Lens, 2015). Механизмы восстановления селенит-ионов бактериями активно изучаются в настоящее время (Lampis *et al.*, 2014). Бактериальный синтез Se-НЧ и описание их свойств (Blum *et al.*, 1998; Oremland *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 2009), использование таких Se-НЧ (Nancharaiah & Lens, 2015; Shirsat *et al.*, 2015; Wadhvani *et al.*, 2016) также активно исследуются. 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 (Tugarova *et al.*, 2014; Vogel *et al.*, 2018).

Целью данной работы было исследование механизмов восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* для получения наночастиц селена и характеристика последних.

В соответствии с заявленной целью были поставлены и решены следующие **задачи**:

- определение способности ряда бактерий рода *Azospirillum* к восстановлению селенита и образованию наночастиц селена;
- подбор условий синтеза наночастиц селена с экстраклеточной локализацией с помощью бактерий рода *Azospirillum*;
- характеристика полученных и очищенных наночастиц селена с использованием биохимических и инструментальных методов;
- исследование биологической активности выделенных и очищенных наночастиц селена;
- изучение участия протон-зависимого транспорта, редокс-системы глутатиона и системы денитрификации в процессе восстановления селенит-ионов с образованием наночастиц селена у азоспирилл.

Научная новизна работы. 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. zeaе*, *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 SeO_3^{2-} , не играет существенной роли.

Научно-практическая значимость. 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.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН) 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.).

Работа выполнена при частичной поддержке грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 16-08-01302-а «Биотехнология бактериального синтеза наночастиц селена, их характеристика и изучение биологической активности *in vitro*» (2016–2018 гг.).

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. zeaе* 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 азоспириллы участвует система денитрификации, при этом редокс-система глутатиона не играет существенной роли.

Апробация работы: Материалы были представлены на 19 научных мероприятиях, из них: 11 международных и 8 российских. Материалы докладывались на: 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.), 33rd 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 Saparica 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.).

Публикации по теме работы. Основное содержание работы представлено в 19 печатных работах, из них 4, включая 2 статьи, – 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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Значение селена для биологических объектов

Селен играет важную роль в жизнедеятельности многих организмов. В составе различных биологических макромолекул он найден у представителей всех доменов жизни, включая вирусы. Он является микроэлементом и включается в активные центры множества ферментов, большая часть которых относится к оксидоредуктазам и защищает от окислительного стресса. Низкомолекулярные соединения селена в живых организмах связаны с метаболизмом селеноцистеина – самой распространенной биологической формы селена, и представляют собой, в основном, структурные аналоги серосодержащих соединений или их производные. Экскреторные соединения селена представлены метилированными формами и селеносахарами (Birringer *et al.*, 2002). Не все живые организмы включают селен в биологические молекулы. Например, в геноме дрожжей не выявлено последовательностей, подтверждающих наличие селенопротеинов. Грибы и растения также не содержат селен в белках. Из архей селенопротеины были найдены только у двух родов – *Methanococcus* и *Methanopyrus* (Rother *et al.*, 2001; Kryukov & Gladyshev, 2004).

В высоких концентрациях селен остро токсичен. Уровень селена, являющийся токсичным, отличается от необходимого всего на один порядок. Это делает селен не похожим ни на один другой микроэлемент. Из-за низкого порога токсичности и, одновременно с этим, незаменимости он был назван «необходимым токсином» (Lenz & Lens, 2009).

В бактериях и археях селен включен в широкий круг метаболических процессов, таких как ассимиляция, метилирование, детоксификация и анаэробное дыхание (Stolz *et al.*, 2006; Stolz & Oremland, 1999; Stolz *et al.*, 2002). Некоторые бактерии способны использовать оксоанионы селена (в основном, селенаты) в качестве конечных акцепторов электронов (Masu *et al.*, 1989; Oremland *et al.*, 1989). Селениты и селенаты могут быть восстановлены до элементарного селена. Конечные продукты

восстановления оксоанионов селена бактериями – красные, аморфные или моноклинные аллотропы Se^0 , накапливающиеся в среде. Далее элементарный селен может быть восстановлен до селенидов (Herbel *et al.*, 2003) или окислен до селенита или селената (Sarathchandra & Watkinson, 1981; Dowdle & Oremland, 1998; Losi & Frankenberger, 1998). Таким образом, бактерии являются главными участниками биогеохимического цикла, влияя на подвижность соединений селена в природе. С другой стороны, изучение процессов трансформации соединений селена бактериями связано не только с фундаментальными аспектами биогеохимии этого халькогена, но и с прикладными – биоремедиацией загрязненных земель, обогащением пищевых продуктов и получением наноматериалов.

1.1.1 Селен как микроэлемент

Селен является микроэлементом; тем не менее, долгое время его биологическая значимость оставалась неизвестной. Впервые положительное действие этого элемента для эукариот было обнаружено в 1957 г.: селен предотвращал некроз печени у крыс (Schwarz&Foltz, 1957). Роль селена как микроэлемента заключается в его способности включаться в белки вместо серы в составе измененных аминокислот – селеноцистеина, селеноцистина и селенометионина.

Потребность *Escherichia coli* в селене при синтезе формиатдегидрогеназы была обнаружена в середине 1950-х. Формиатдегидрогеназа позволяет *E. coli* использовать формиат в качестве главного донора электронов в процессе анаэробного дыхания с использованием нитрата в качестве акцептора электронов. В среде, не содержащей селенит, синтез формиатдегидрогеназы бактерией невозможен (Pinsent, 1954).

Наиболее распространенной селеносодержащей аминокислотой в бактериях является селеноцистеин. Некоторые бактериальные селенопротеины представлены в табл. 1. Наиболее распространенными среди бактерий и архей селенопротеинами являются формиатдегидрогеназы (Peng

et al., 2016). У *E. coli* было идентифицировано по крайней мере две формиадегидрогеназы – FdhO и FdhN (Sawers *et al.*, 2004). Селен в форме селеноцистеина был найден в формиадегидрогеназах бактерий рода *Salmonella*, *Clostridium* и *Methanococcus*, а также в гидрогеназах бактерий рода *Methanococcus* и других анаэробов. У некоторых клостридий, ферментирующих пурины (*C. purinolyticum*, *C. acidurici* и *C. cylindrosporum*), селеноцистеин входит в состав глицинредуктазы. Система глицинредуктазы необходима для синтеза ацетата через глицин (Cone *et al.*, 1976; Normann & Andreesen, 1989; Dietrichs *et al.*, 1991; Garcia & Stadtman, 1992; Meyer *et al.*, 1995; Fonknechten *et al.*, 2010). В некоторых бактериальных селеносодержащих ферментах селен является частью активного сайта. Такими ферментами являются: дегидрогеназа никотиновой кислоты и ксантиндегидрогеназа, найденные у некоторых видов клостридий, *C. acidurici*, *C. cylindrosporum* и *C. barkeri*, а также у *Desulfobacterium niacini* (Heider & Bock, 1993); ксантиндегидрогеназа и пурингидроксилаза у *C. purinolyticum* (Self & Stadtman, 2000; Self *et al.*, 2003); ксантиндегидрогеназа и гидроксилазы никотиновой кислоты у *Eubacterium barkeri* (Gladyshev *et al.*, 1994; Schröder *et al.*, 1999).

Известно, что многие аэробные бактерии имеют L-селеноцистеинлиазу (Chocat *et al.*, 1983). Она катализирует пиридоксаль-5'-фосфат-зависимое расщепление L-селеноцистеина на L-аланин и элементарный селен. При этом для расщепления селеносодержащих белков не обязательно наличие специфического фермента: *E. coli* имеет три цистеиндесульфуразы, способные расщеплять как цистеин, так и селеноцистеин (Mihara *et al.*, 2000). Пример другого фермента, субстратом для которого являются селеноаминокислоты, – D-селеноцистеин- α,β -лиаза. Она была найдена у анаэробных бактерий – клостридий *C. sticklandii* и *C. sporogenes* (Esaki *et al.*, 1988).

Таблица 1 – Селенопротеины бактерий

Селенопротеин	Ген	Организм	Ссылка
α -субъединица формиатдегидрогеназы	<i>fdhA</i>	<i>E. coli</i>	Cox <i>et al.</i> , (1981)
Селенофосфатсинтетаза	<i>seld</i>	<i>Eubacterium acidaminophilum</i>	Gursinsky <i>et al.</i> , (2008)
Глицинредуктаза протеин А	<i>grdA</i>	<i>Clostridium sticklandii</i>	Cone <i>et al.</i> , (1976)
Глицинредуктаза протеин В	<i>grdB</i>	<i>E. acidaminophilum</i>	Wagner <i>et al.</i> , (1999)
Пролинредуктаза	<i>prdB</i>	<i>C. sticklandii</i>	Kabisch <i>et al.</i> , (1999)
Саркозинредуктаза	–	<i>E. acidaminophilum</i>	Hormann & Andreesen (1989)
Бетаинредуктаза	–	<i>E. acidaminophilum</i>	Meyer <i>et al.</i> , (1995)
α -субъединица коэнзим F ₄₂₀ - восстанавливающей гидрогеназы	<i>frhA</i>	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
δ -субъединица коэнзим F ₄₂₀ - восстанавливающей гидрогеназы	<i>frhD</i>	<i>S. fumaroxidans</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Субъединица А гетеродисульфидредуктазы	<i>hdrA</i>	<i>S. fumaroxidans</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Тиоредоксин	<i>trx</i>	<i>Treponema denticola</i>	Kim <i>et al.</i> , (2015)
Глутаредоксин	<i>grx</i>	<i>Clostridium sp.</i>	Kim <i>et al.</i> , (2015)
Пероксиредоксин	<i>prx</i>	<i>E. acidaminophilum</i>	Sohling <i>et al.</i> , (2001)
Пероксиредоксинподобная тиол- дисульфид оксидоредуктаза	–	<i>Geobacter metallireducens</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Тиол-дисульфидоксидоредуктаза	–	<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Fe-S оксидоредуктаза	<i>glpC</i>	<i>S. fumaroxidans</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
НАДН оксидаза	–	<i>G. metallireducens</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Метионинсульфоксидредуктаза	<i>msrA</i>	<i>Clostridium sp.</i>	Kim <i>et al.</i> , (2009)
Электронпереносящий белок	<i>prdC</i>	<i>C. sticklandii</i>	Fonknechten <i>et al.</i> , (2010)
Глутатионпероксидаза	<i>gpx</i>	<i>T. denticola</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Арсенатредуктазоподобный белок (ArsC-like)	–	<i>D. psychrophila</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Тиол-дисульфидоксидо- редуктазоподобный белок (DsbA- like)	–	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Тиол-дисульфидоксидо- редуктазоподобный белок (DsbG- like)	–	<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Тиол-дисульфидоксидо- редуктазоподобный белок (DsbE- like)	–	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
Гомолог алкилпероксидредуктазы (Homolog of AhpF)	–	<i>Carboxythermus hydrogenoformans</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2006)

Для человека было идентифицировано 25 селеносодержащих белков (Kryukov *et al.*, 2003). Анализ с использованием биоинформационных методов показал присутствие в ДНК многих микроорганизмов последовательностей, кодирующих селенопротеины (Zhang *et al.*, 2006). Большинство продуктов этих генов пока экспериментально не охарактеризовано.

Помимо белков, в бактериях есть и другие соединения, содержащие селен – это некоторые бактериальные тРНК, экзополисахариды (Ding *et al.*, 2014) и фикоцианины, найденные в обогащенной селеном *Spirulina platensis* и обладающие сильной антиоксидантной активностью (Chen & Wong, 2008).

1.1.2 Токсичность соединений селена

В высокой концентрации селен остро токсичен, несмотря на то, что он является важным микроэлементом в питании. Самыми токсичными формами селена являются его оксоанионы: селенат – SeO_4^{2-} (Se(+6)) и селенит – SeO_3^{2-} (Se(+4)). Механизм токсичности селена основан на его способности связываться с богатыми серой белками, нарушая при этом дисульфидные связи, вследствие химической аналогии между этими двумя элементами, в итоге нарушая функции этих белков (Stadtman, 1974). Также токсическое действие селена может быть связано с окислительным стрессом (Hoffman, 2002). Биологическая токсичность селена была впервые отмечена в 1856 г.: тогда было обнаружено, что он связан с «щелочной болезнью», сейчас называемой селенозом. Симптомы ее включают ненормальную потерю волос, ломкость ногтей и поражения кожи (Hatfield *et al.*, 2014).

Селен является загрязнителем окружающей среды и занимает 145 место в списке токсических веществ по данным американского Агентства по регистрации токсичных веществ и заболеваний (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), <https://www.atsdr.cdc.gov/spl>). Предельно допустимая концентрация селена, согласно ВОЗ, в питьевой воде составляет суммарно 0,01 мг/л (СанПиН 2.1.4.1074-01; <http://docs.cntd.ru/document/901798042>).

Селен попадает в окружающую среду как из геохимических, так и из антропогенных источников. Природное загрязнение селеном может происходить в результате выветривания загрязненных им почв и горных пород. В большинстве почв концентрация селена очень низкая, от 0,01 до 2 мг/кг. Тем не менее, в загрязненных селеном почвах были зарегистрированы концентрации селена до 1200 мг/кг. Почвы некоторых регионов России имеют повышенное содержание селена. Например, почвы Тувы содержат до 8000 мг/кг селена природного происхождения (Chasteen & Bentley, 2002). В природных водах концентрации растворенного селена составляют от 0,1 до 100 мкг/л. Антропогенное загрязнение соединениями селена зафиксировано в Алтайском крае, где отмечено содержание селена, в 1,7 раз превышающее ПДК в водоносном горизонте и в 4 раза (40 мкг/л) в мелких водоемах Барнаула (Гусева, 2008). Были обнаружены грунтовые воды с очень высокими концентрациями селена: 275 мкг/л в селен-загрязненных водоемах в Китае, 1000 мкг/л в Монтане (США) и до 2000 мкг/л – в водах соленых водоемов (Fordyce, 2013).

Накопление большого количества селена в воде и почве приводит к серьезным экологическим проблемам. Например, в середине 1970-х в Северной Каролине (США) выщелачивание селена из угольной золы в окрестностях водохранилища Belews Lake привело к исчезновению в нем 19 из 20 видов рыб (Lemly, 2002). Замена воды в прудовой системе Национального заповедника дикой природы Кестерсон сельскохозяйственными дренажными водами западной долины Сан-Хоакин в Калифорнии привело к значительному увеличению гибели и эмбриональных уродств водоплавающих птиц и других диких животных из-за загрязнения среды их обитания селеном (Presser & Ohlendorf, 1987; Ohlendorf, 1989; Presser, 1998).

Антропогенное загрязнение селеном обусловлено горнодобывающей промышленностью, переработкой металлов, дымовыми газами и другими видами промышленной деятельности. Например, чрезмерная промышленная

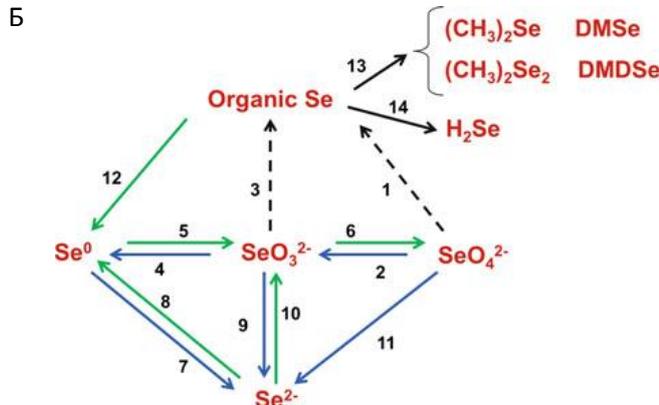
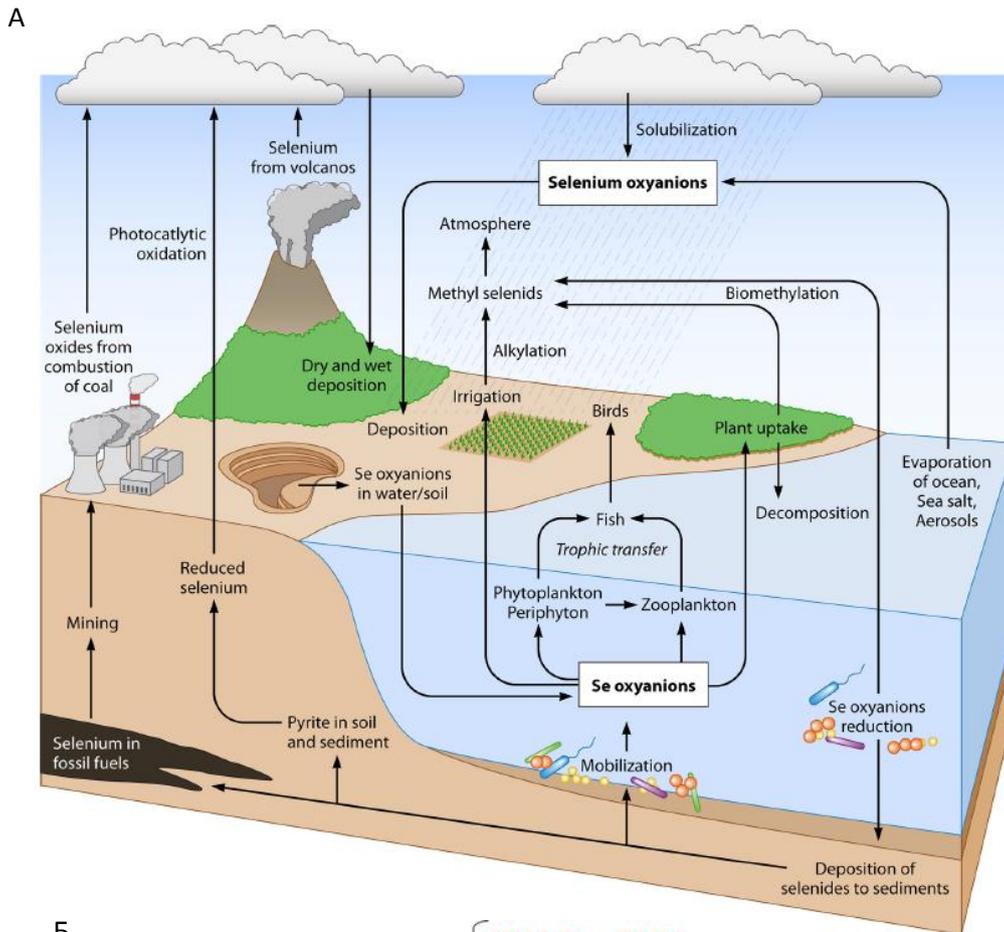
разработка фосфатного месторождения в водосборе реки Блэкфут в Айдахо существенно повысила уровень селена в реке (Myers, 2013).

Чувствительность к токсическому действию соединений селена у микроорганизмов сильно различается. Существуют бактерии, способные выдерживать очень высокие концентрации оксоанионов селена. Например, *Pseudomonas* sp. CA5 способна выдерживать до 150 мМ селенита, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* – до 200 мМ (Hunter & Manter, 2009). Минимальные ингибирующие концентрации селенита натрия для бактерий *Lysinibacillus xylanilyticus* и *L. macrolides* составляют 120 и 220 мМ, а селената – 800 и 700 мМ (Zhang *et al.*, 2019).

Эксперименты по восстановлению селенита *A. brasilense* Cd с использованием образцов вод, отобранных из природных источников (реки Шпрее и шахтных вод Кёнигштайна), показали принципиальную возможность использования бактерий для очистки загрязненных селенитом вод (Vogel *et al.*, 2018). Восстановление с участием микроорганизмов водорастворимых токсичных оксоанионов селена до нерастворимых форм элементарного селена или селенидов металлов является основой перспективных подходов в биоремедиации загрязнений селеном (Lenz & Lens, 2009; Stolz *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2013).

1.1.3 Биогеохимический цикл селена

Впервые полный биогеохимический цикл соединений селена (рис. 1) был описан Шрифтом (Shrift, 1964). Он включает неорганические и органические формы селена; их распределение в окружающей среде зависит от преобладающих окислительно-восстановительных условий (Minaev *et al.*, 2005). Одну из главных ролей в трансформациях соединений селена в природе играют бактерии.



А – Инфографика (Nancharaiyah & Lens, 2015);

Б – Общая схема цикла (Staicu & Barton, 2017); 1 – ассимиляционное восстановление селената; 2 – восстановление селената; 3 – ассимиляционное восстановление селенита; 4 – восстановление селенита до Se^0 ; 5 – окисление Se^0 ; 6 – окисление селенита; 7 – восстановление элементарного селена до селенида; 8 – окисление селенида до Se^0 ; 9 – восстановление селенита до селенида; 10 – окисление селенида альдегидферредоксиноксидоредуктазой, нитритредуктазой и пероксиредоксином; 11 – восстановление селената без накопления селенита в качестве промежуточного продукта; 12 – реакции с участием тиолредуктаз; 13 – реакции метилирования с участием почвенных бактерий; 14 – реакции с участием селеноцистеинлиаз. Прерывистой линией показано ассимиляционное восстановление. Зелеными линиями обозначены окислительные реакции, голубыми – восстановительные реакции, черными линиями обозначены реакции метилирования и продукции H_2Se .

Рисунок 1 – Биогеохимический цикл селена

Селен имеет широкий диапазон степеней окисления, от -2 до $+6$, и доступен в различных химических и физических (твердой, жидкой и газообразной) формах. Селен относится к халькогенам и химически схож с серой и теллуром. В отличие от серы, селен распространен в земной коре неравномерно. Он часто присутствует в земной коре в нано- и микромолярных концентрациях. В природе селен часто связан с металлосульфидными минералами (пиритом, халькопиритом) и присутствует в биолитах – осадочных породах биологического происхождения, таких как уголь, нефть, битуминозные (горючие) сланцы, а также может присутствовать в загрязненных им почвах (Winkel *et al.*, 2011).

Высвобождение селена из природных источников происходит при добыче полезных ископаемых, сжигании ископаемого топлива, в результате сельскохозяйственной деятельности, а также при извержении вулканов и использовании ядерного топлива. Попадая в воздух в виде оксидов, селен солюбилизируется и попадает в почву и воду в форме растворимых оксоанионов – SeO_4^{2-} и SeO_3^{2-} . Было показано, что селенат является преобладающей формой селена в поверхностных водах Индийского океана, а с глубиной увеличивается концентрация селенита. Обе эти формы селена биодоступны и токсичны (Hamilton, 2004). Оксоанионы селена остаются в окружающей среде долгое время вследствие того, что их растворимость не зависит от pH и они ограниченно взаимодействуют с катионами (Chapman *et al.*, 2010).

Описано множество бактерий, способных восстанавливать селенат как в результате ассимиляции, используя селен в качестве микроэлемента для включения в различные органические соединения, так и в результате диссимиляции. В последнем случае селенат используется бактериями в качестве конечного акцептора электронов для получения энергии (Macy *et al.*, 1989; Oremland *et al.*, 1989). Селенит восстанавливается бактериями в результате либо ассимиляции, либо детоксификации, в последнем случае образуется Se^0 . Элементарный селен нерастворим в воде и менее токсичен

(Fernandez-Martinez & Charlet, 2009). Несмотря на это, биогенный Se^0 биодоступен для фильтрующих моллюсков и рыб (Luoma *et al.*, 1992; Schlekot *et al.*, 2000). Органические формы селена переходят по пищевой цепи и попадают в животные клетки. Было описано, что примерно 80% селена в поверхностных водах Северной и южной части Тихого океана находится в форме органических соединений (Cutter & Bruland, 1984). Его распределение коррелировало с максимумами основной продуктивности, пигментов и растворенных свободных аминокислот. Разложение мертвых организмов высвобождает селен в окружающую среду. Нерастворимый Se^0 находится преимущественно в анаэробной зоне (Stolz & Oremland, 1999), где преобладающие условия – восстановительные. В таких условиях элементарный селен может быть далее восстановлен до селенидов, которые связываются с катионами металлов и органическими соединениями, формируя селениды металлов (Herbel *et al.*, 2003) и органоселениды. Органические соединения, содержащие селен в низшей степени окисления (Se^{2-}) могут находиться в среде в виде метилселенидов. Наиболее часто встречающиеся формы метилированного селена – диметилселенид и диметилдиселенид. Реакции метилирования селенидов до метилселенидов, метилселенидов до диметилселенидов и последующие превращения этих соединений до триметилселенидиума $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$ были описаны в 1960-х – 1980-х гг. (Ganther, 1966; Hsieh & Ganther, 1977; Mozier *et al.*, 1988). На примере почвенной бактерии рода *Corynebacterium* было показано, что диметилселенид может образовываться фактически из всех возможных соединений селена (селенитов, селенатов, элементарного селена, селеноцистеина и др.) (Doran & Alexander, 1977). Бактерия *Pseudomonas stutzeri* NT-I способна синтезировать диметилселенид и диметилдиселенид из селенита, селената и элементарного селена (Kagami *et al.*, 2013). Еще одна летучая форма селена, селеноводород, является структурным аналогом H_2S . Он образуется в результате восстановления органических форм и проявляет высокую токсичность (Doran & Alexander, 1977; Dungan & Frankenberger, 2001).

Реакции в окислительной части цикла трансформаций соединений селена проходят значительно медленней (на 3–4 порядка), чем в восстановительной. Элементарный селен может окисляться бактериями до SeO_3^{2-} и SeO_4^{2-} (Sarithchandra & Watkinson, 1981; Dowdle & Oremland, 1998; Losi & Frankenberger, 1998). Однако исследований на эту тему гораздо меньше. При этом неясно, какую выгоду получают бактерии при окислении элементарного селена. Вероятно, этот процесс сопряжен с окислением бактериями других субстратов, а не служит для получения энергии. Таким образом, бактерии вовлечены в большинство процессов трансформации селена и играют ключевую роль в биогеохимическом цикле этого элемента.

1.2 Метаболизм селена у бактерий

Бактерии многих филогенетических групп способны к трансформации соединений селена. Механизмы преобразований таких соединений многообразны и различаются у разных видов бактерий. Метаболизм селена у микроорганизмов привлек внимание исследователей во второй половине 1980-х гг. Этому предшествовали несколько случаев загрязнения окружающей среды селенитами и селенатами. Первое из таких событий произошло в Северной Каролине (США) в середине 1970-х годов и было связано с выщелачиванием селена из угольной золы и загрязнению водоема (Lemly, 2002). Второе произошло в Калифорнии (США), когда экстенсивное орошение привело к утечке токсичных соединений селена из загрязненных им земель в водоемы заповедника Кестерсон (Presser & Ohlendorf, 1987; Ohlendorf, 1989; Presser, 1998).

В это же время была открыта способность некоторых бактерий использовать соединения селена для анаэробного дыхания (Macy *et al.*, 1989; Oremland *et al.*, 1989). Это открытие пролило свет на биогеохимию соединений селена и ключевую роль бактерий в биогеохимическом цикле селена. Впервые редуктаза с высокой аффинностью к селену была идентифицирована в периплазме *Thauera selenatis* (Macy *et al.*, 1993).

Позднее было идентифицировано большое количество бактерий, получающих энергию за счет использования оксоанионов селена в качестве конечных акцепторов электронов при анаэробном дыхании (Oremland *et al.*, 1994; Laverman, *et al.*, 1995; Stolz & Oremland, 1999). Эти оксоанионы также могут быть и токсикантами. Одной из стратегий детоксификации соединений селена бактериями является продукция нерастворимых наночастиц со значительно сниженной токсичностью.

1.2.1 Транспорт селенатов и селенитов в клетку

О первом этапе метаболизма селена – транспорте селенатов и селенитов внутрь бактериальной клетки – на данный момент известно мало. Было продемонстрировано, что транспорт оксоанионов селена в клетку включает два типа транспортера сульфатов: сульфат-тиосульфатпермеазы (Turner *et al.*, 1998) и сульфатпермеазы SulP (Zolotarev *et al.*, 2008). Например, для *E. coli* было показано, что селенит может быть транспортирован в клетку с помощью сульфатпермеаз, хотя значительное поглощение селенита осуществляется и после выключения этого транспортера, что указывает на существование по крайней мере еще одной системы поглощения селенита (Muller *et al.*, 1997, Lacourciere *et al.*, 2002).

Сульфат-тиосульфатпермеазы относятся к сульфат/вольфрамат-транспортному (SulT) семейству суперсемейства ABC-транспортеров. У *E. coli* и *Salmonella typhimurium* было идентифицировано два типа сульфат-тиосульфатпермеаз SulT. Транспорт селената с участием SulP сульфатпермеазы был показан для *Mycobacterium tuberculosis* (Zolotarev *et al.*, 2008) и для *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Avoscan *et al.*, 2009).

На основании геномного анализа недавно было предположено, что мембранный белок YedE (содержащий десять трансмембранных доменов, являющихся гомологами сульфат-транспортеров (Gristwood *et al.*, 2011)) также может быть включен в транспорт соединений селена (Lin *et al.*, 2015). Он был найден только в организмах, способных к трансформации

соединений селена. Транспортёры, связанные с метаболизмом серы, содержат несколько консервативных остатков глицина и инвариантный остаток цистеина, вероятно, выполняющих важную функциональную роль. Локус гена *yedE* часто локализован рядом с генами, отвечающими за метаболизм соединений Se, такими как гены SirA-подобных SelD и Sec-лиаз у многих бактерий различных филогенетических групп (Lin *et al.*, 2015). Это указывает на возможную включённость этого белка в метаболизм селена. Похожую связь YedE и SelD можно наблюдать у архей, у которых ген *yedE* разделен на два соседних гена (Lin *et al.*, 2015). Существует неспецифическая низкоэффективная анионтранспортная система, требующая высоких концентраций молибдата, также способная к транспорту сульфата, селената и селенита. Однако этот транспортёр до сих пор полностью не охарактеризован (Aguilar-Barajas *et al.*, 2011). Быстрый транспорт селенита внутрь клетки через несколько часов его медленного поглощения у микроорганизма *Ralstonia metallidurans*, предположительно, обусловлен медленной активацией неизвестной транспортной системы селенита, и таким образом селенит накапливается в клетке за счёт двух конкурирующих путей: ассимиляции и детоксификации (более медленного). У *Rhodobacter sphaeroides* перенос селенита в цитоплазму предположительно осуществляется транспортёром многоатомных спиртов (Vebien *et al.*, 2001). Специфических транспортёров селенита у микроорганизмов не выявлено.

1.2.2 Механизмы трансформации оксоанионов селена

Механизмы микробного метаболизма соединений селена разнообразны, изучены не до конца и могут включать различные пути, включающие разные группы ферментов, белков или пептидов. Все возможные пути трансформации оксоанионов селена бактериями можно разделить на: (1) ассимиляционный метаболизм – использование для синтеза селеносодержащих соединений; (2) диссимиляционный метаболизм –

получение энергии при использовании селенатов и, в меньшей степени, селенитов в качестве конечных акцепторов электронов; (3) детоксификация.

Восстановление селенита может быть разделено на два процесса: анаэробное дыхание и детоксификацию. Последнюю можно рассматривать как частный случай диссимиляционного метаболизма. Процессы детоксификации не связаны с получением энергии для бактериального роста. У бактерий более распространена способность к восстановлению селенита, чем селената. Множество бактерий способно к восстановлению селенита до элементарного селена в процессе детоксификации (Sura-de Jong *et al.*, 2015). Сообщений об использовании селенита в качестве дыхательного субстрата фактически нет. Специфических генов, вовлеченных в восстановление селенита, на данный момент не идентифицировано. Для этого процесса предложено несколько основных механизмов (рис. 2): так называемые Painter-type reactions, или реакции с участием тиоловых групп (Painter, 1941); участие системы тиоредоксин-тиоредоксинредуктаза; сидерофор-опосредованное восстановление; сульфид-опосредованное восстановление; диссимиляционное восстановление (Zannoni *et al.*, 2007).

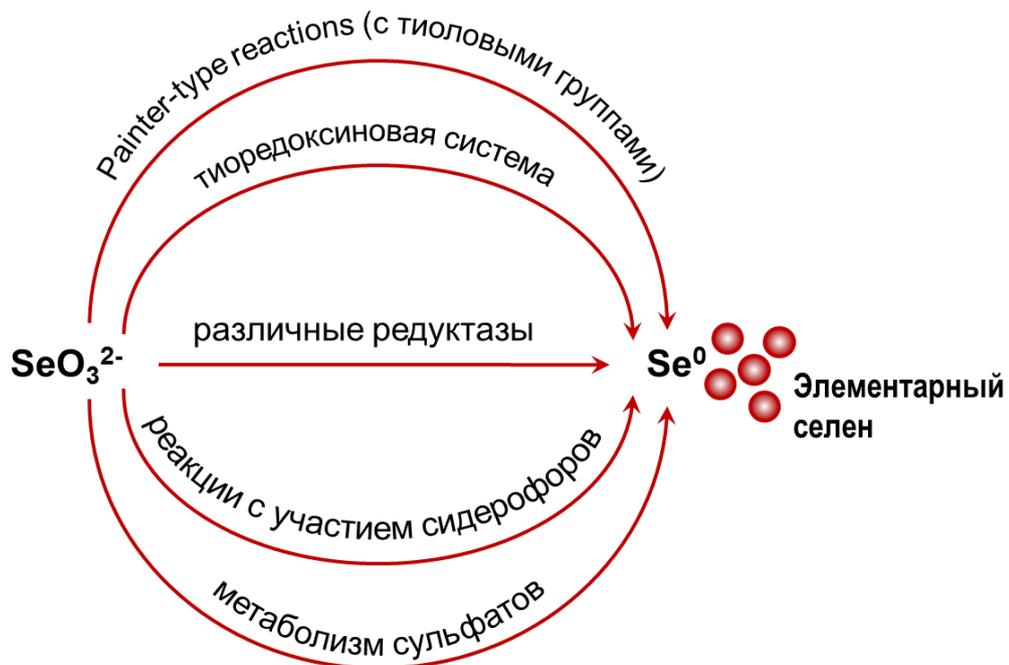


Рисунок 2 – Предполагаемые механизмы восстановления селенит-ионов до элементарного селена (адаптировано из Nancharaiyah & Lens, 2015)

Процесс детоксификации соединений селена также может включать метилирование селеносодержащих соединений, происходящее, по-видимому, в результате передачи метильных групп через S-аденозилметиониновую систему (Gadd, 1993).

1.2.2.1 Ассимиляция

Ассимиляционный метаболизм селена встречается у многих микроорганизмов и связан с их способностью использовать оксоанионы селена в качестве субстратов для получения биологически активных соединений селена, таких как селеносодержащие аминокислоты, кофакторы и нуклеотид (селеноуридин, SeU). Механизм ассимиляции селена у всех бактерий одинаков. Наиболее важной и лучше всего охарактеризованной формой селена в биологических макромолекулах является селеноцистеин (Sec) – аминокислота, в которой сера заменена на селен. Метаболизм биологических соединений селена у микроорганизмов был подробно охарактеризован, а также были идентифицированы связанные с этим процессом гены. Это гены биосинтеза: селеноцистеина (Sec) – *selA*, *selB*, *selC*, и *selD* в бактериях и *PSTK*, *SepSecS*, *selB*, *selC*, и *selD* в археях; 2-селеноуридина (2-SeU) – *ybbB*; селеносодержащих кофакторов – *yqeB* и *yqeC*. Ген *selD*, кодирующий селенофосфатсинтетазу, в большинстве случаев необходимый для синтеза селеноцистеина, селеноуридина и селеносодержащих кофакторов, является главным биомаркером для определения способности бактерий к трансформации соединений селена (Zhang *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2015). Недавно было проведено сравнительное геномное исследование более чем 5200 секвенированных последовательностей бактериальных геномов для выявления способности к трансформации соединений селена. Среди исследованных видов 1121 были способными к синтезу селеноцистеина (21,5%), 980 – селеноуридина (18,8%) и 312 – селеносодержащих кофакторов (6%) (Peng *et al.*, 2016).

Выгода от замены серы на селен может заключаться в увеличении каталитической активности селеносодержащих ферментов по сравнению с серосодержащими (Zhong & Holmgren, 2000). Считается, что для этого есть три причины: селеноцистеин – лучший нуклеофил по сравнению с цистеином; селенол является лучшей "уходящей группой" по сравнению с тиолом; селен имеет бóльшую способность принимать электроны (лучший электрофил) по сравнению с серой. Однако замена серы на селен в ферменте не всегда связана с увеличением его каталитической активности. Так, при сравнении селеноцистеинсодержащей селенофосфатсинтетазы *Haemophilus influenzae* с ее цистеинсодержащим аналогом из *E. coli* было выявлено, что последняя имеет бóльшую специфичность (Lacourciere & Stadtman, 1999), цистеинсодержащая тиоредоксинредуктаза у *Drosophila melanogaster* имела сходную каталитическую активность с селеноцистеинсодержащим ортологом (Kanzok *et al.*, 2001). Химико-биологическая функция селена может быть связана со способностью селеносодержащих ферментов сопротивляться окислительной инактивации. Селен образует более слабые по сравнению с серой π -связи, поэтому он может обратимо реагировать с кислородом и другими окислителями легче, чем сера. Таким образом, оксиды селена имеют бóльшую способность к химическому восстановлению. Это имеет важное значения для использования селена в ферментах, защищающих от окислительного стресса – оксидоредуктазах и пероксидазах (Reich & Hondal, 2016).

1.2.2.2 Диссимиляция

Некоторые бактерии способны к использованию оксоанионов селена, чаще всего селенатов, в качестве конечных акцепторов электронов в анаэробных условиях (Oremland *et al.*, 1994; Laverman *et al.*, 1995; Stolz & Oremland, 1999). Были идентифицированы гены, ответственные за восстановление селената, такие как *serABCD* в *T. selenatis* (Lowe *et al.*, 2010), *srdBCA* в *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 (Kuroda *et al.*, 2011), и *ygfKLMN* и *ynfEGH-dmsD* опероны в *E. coli* (Bebien *et al.*, 2002; Guymier *et al.*, 2009).

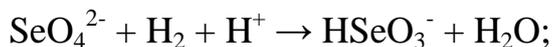
Диссимиляционный метаболизм соединений селена у бактерий связан с использованием оксоанионов селена в качестве конечных акцепторов электронов для получения энергии. При этом процесс происходит ступенчато: сначала Se(VI) восстанавливается до Se(IV), а затем Se(IV) – до Se(0). Этот процесс описывается следующими уравнениями:



Обе реакции термодинамически выгодны. Однако доказательств использования энергии, полученной при восстановлении селенита, для поддержания бактериального роста на сегодняшний день нет. Считается, что восстановление селенатов происходит в результате анаэробного дыхания, а восстановление селенитов – в результате процессов детоксификации.

Использование оксоанионов селена в качестве конечных акцепторов электронов энергетически выгодно. Окислительно-восстановительный потенциал пары $\text{SeO}_4^{2-}/\text{SeO}_3^{2-}$ составляет +0,48 В.

Свободные энергии для восстановления SeO_4^{2-} и SeO_3^{2-} , связанного с окислением H_2 , следующие (Stolz & Oremland, 1999, Newman *et al.*, 1998):



$$\Delta G' = -15,53 \text{ ккал/ моль};$$

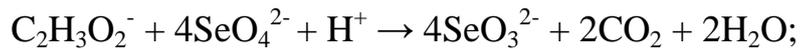


$$\Delta G' = -8,93 \text{ ккал/моль}.$$

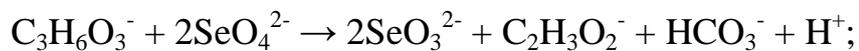
Данные уравнения показывают, что восстановление оксоанионов селена может быть важным механизмом получения энергии для микроорганизмов в природных условиях. Возможность диссимиляционного восстановления Se(VI) бактериями впервые была описана в 1989 г. В этой работе использовались анаэробные микроорганизмы, полученные из испарительного пруда для сельскохозяйственных сточных вод (Oremland *et al.*, 1989). Восстановление селената было сопряжено с продукцией стехиометрических количеств элементарного селена, ингибировалось добавлением других акцепторов электронов (кроме SO_4^{2-} и FeOOH) и

катализировалось добавлением доноров электронов. Конечными продуктами восстановления селената, связанного с окислением ацетата, были элементарный селен и CO_2 .

В дальнейшем было показано, что бактериальное восстановление селената до селенита связано с окислением формиата, ацетата или лактата. Полученная энергия используется для поддержания роста (Macy *et al.* 1989; Oremland *et al.* 1994):



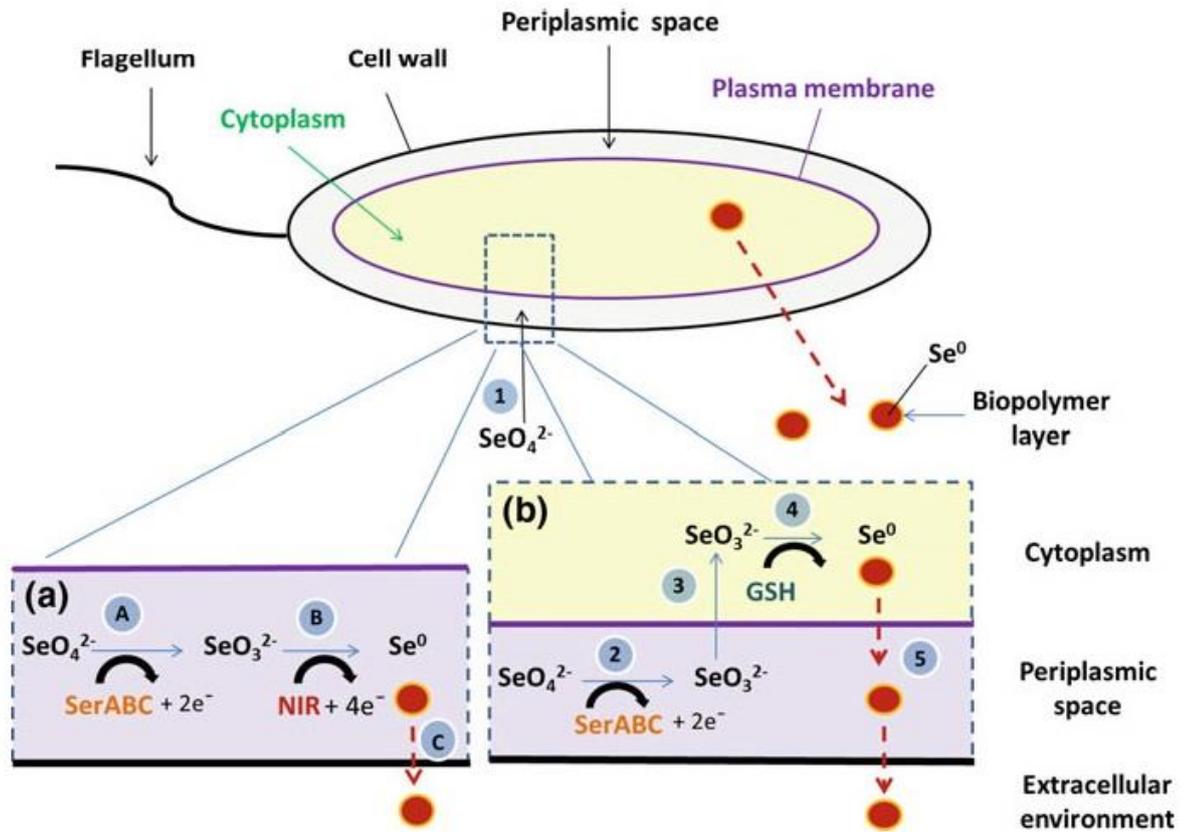
$$\Delta G_f^0 = -556 \text{ кДж/моль ацетата } (\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-);$$



$$\Delta G_f^0 = -343,1 \text{ кДж/моль лактата } (\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3^-).$$

Исследование респираторного восстановления селената началось с изучения этой способности у граммотрицательной бактерии *T. selenatis*. На сегодняшний день восстановление селената наиболее полно описано для четырех бактерий: *T. selenatis*, *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 (у этой бактерии процесс восстановления, вероятно, связан с детоксификацией), *E. coli* и *B. selenatarsenatis* SF-1. *T. selenatis* может эффективно восстанавливать селенат до селенита в анаэробных условиях (Rech & Macy, 1992). При этом в качестве донора электронов для восстановления селената используется ацетат (Macy *et al.*, 1989). Похожая реакция используется бактериями *Sulfurospirillum barnesii* и *Bacillus arsenicoselenatis* для восстановления селената до селенита; однако, донором электронов является преимущественно лактат (Oremland *et al.*, 1994; Blum *et al.*, 1998). Эта реакция проходит в периплазме бактерии (рис. 3).

Именно из *T. selenatis* впервые была выделена респираторная селенатредуктаза – фермент, отвечающий за дыхательное восстановление селената. Селенатредуктаза из *S. barnesii* показывает высокую активность для селената, но также способна восстанавливать нитрат, тиосульфат и фумарат.



1 – транспорт селената внутрь клетки через клеточную стенку; (a) А – восстановление селената до селенита в периплазматическом пространстве, катализируемое селенатредуктазой, SerABC; В – восстановление селенита до элементарного селена в периплазме, возможно, катализируемое нитритредуктазой, NIR; С – выделение элементарного селена, покрытого слоем биополимеров, во внеклеточное пространство (модель по Masu *et al.*, 1993); (b) 2 – восстановление селената до селенита в периплазме, катализируемое селенатредуктазой, SerABC; 3 – транспорт селенита в цитоплазму; 4 – восстановление селенита до элементарного селена, катализируемое тиолами (глутатион, GSH); 5 – выделение элементарного селена, покрытого слоем биополимеров, во внеклеточное пространство (модель по Debieux *et al.*, 2011). Донор электронов не указан.

Рисунок 3 – Трансформация соединений селена в бактериях *T. selenatis*

(Staicu *et al.*, 2017)

По сравнению с периплазматической селенатредуктазой *T. selenatis*, мембраносвязанная редуктаза *S. barnesii* имеет гораздо более широкую субстратную специфичность (Stolz & Oremland, 1999). Этот фермент является гетеротетрамером со следующим субъединичным составом: 82, 53, 34 и 21 кДа. K_m для селената составляет 12 μM .

Селенат может восстанавливаться и другими редуктазами вследствие его химического подобия их субстратам. Например, периплазматическая нитратредуктаза *R. sphaeroides* и мембраносвязанная нитратредуктаза *E. coli* способны к восстановлению селената. Нитратредуктазы *C. metallidurans* CN34 (ранее квалифицированной как *Ralstonia eutropha*), *Paracoccus denitrificans* и *Paracoccus pantotrophus* также способны использовать селенат в качестве конечного акцептора электронов (Sabaty *et al.*, 2001); однако, эти ферменты используют селенат только в отсутствие нитрата.

У *E. coli* было идентифицировано по крайней мере три системы восстановления селената. Селенатредуктаза, кодируемая *ynfEGHdmsD*-опероном, зависит от системы Tat (твин-аргинин-зависимой системы транслокации, twin-arginine translocation system) (Guymer *et al.*, 2009). Предположительно, каталитическая субъединица YnfE связывается с бис-молибдоптериновым гуанидинуклеотидным кофактором в составе [4Fe-4S]-кластера. Малая субъединица YnfD содержит четыре [4Fe-4S]-связывающих мотива, каждый из которых содержит четыре консервативных остатка цистеина. Было продемонстрировано, что другая селенатредуктаза *E. coli* представляет собой структурный комплекс, включающий белки YgfK, YgfM и YgfN, предположительно кодируемые *ygfKLMN*-опероном (Bebien *et al.*, 2002). Нитратредуктазы A и Z *E. coli* (кодируемые *narGHJ* и *narZUWV*-оперонами) и периплазматическая нитратредуктаза NarA, несмотря на низкую активность, также были способны восстанавливать селенат (Avazeri *et al.*, 1997).

Было показано, что рост грамположительной бактерии *B. selenatarsenatis* SF-1 сопровождается восстановлением селената (Fujita *et al.*, 1997). При этом происходит окисление стехиометрического количества лактата. С использованием транспозонного мутагенеза были идентифицированы гены, включенные в этот процесс. Было предположено, что *srdBCA*-оперон кодирует оксидоредуктазный комплекс, проявляющий функцию респираторной селенатредуктазы (Kuroda *et al.*, 2011). Этот

фермент представляет собой трансмембранный тример, содержащий молибден. Электроны из хинолового пула переносятся Fe-S-белком SrdB на каталитическую субъединицу SrdA и далее на селенат через молибденсодержащий кофактор SrdA (Kuroda *et al.*, 2011).

Существует несколько сообщений о восстановлении селенита, связанном с бактериальным ростом. В 1998 г. было описано восстановление селенита галоалкофильной бактерией *Bacillus selenitireducens*. Авторы указывают, что в их исследовании впервые доказано использование селенита в качестве дыхательного субстрата для бактериального роста (Blum *et al.*, 1998).

Для бактерии *Bacillus beveridgei* MLTeJB также было показано использование Se(IV) в качестве конечного акцептора электронов для анаэробного роста (Baesman *et al.*, 2009). С помощью мутантов *Shewanella oneidensis* MR-1, дефектных по синтезу периплазматических терминальных редуктаз (нитратредуктазы, нитритредуктазы и фумаратредуктазы), было установлено, что у данной бактерии восстановление селенита происходит с участием респираторных электронтранспортных путей (Li *et al.*, 2014). Было показано, что фумаратредуктаза катализирует восстановление селенит-ионов, а цитохром А направляет электроны из хинолового пула к фумаратредуктазе. При этом не выяснено, используется ли полученная в этом процессе энергия для роста или процесс используется для детоксификации.

Однако на сегодняшний день нет публикаций, в которых достоверно доказывается использование энергии, полученной в результате восстановления селенита до элементарного селена, для бактериального роста. Считается, что восстановление селенита связано с детоксификацией.

Способность к "дыханию селенатом" распространена не только среди бактерий. Некоторые виды гипертермофильных архей используют селенат в качестве конечного акцептора электронов с накоплением селенитов (Huber *et al.*, 2000). *Pyrobaculum arsenaticum* использует селенат для органотрофного

дыхания, а *Pyrobaculum aerophilum* растет литоавтотрофно с использованием CO_2 , H_2 и селената.

Существуют и другие микроорганизмы, способные "дышать" SeO_4^{2-} : *Salana multivorans* (von Wintzingerode *et al.*, 2001); *Enterobacter taylorae* (Zahir *et al.*, 2003); *Citrobacter freundii* (Zhang *et al.*, 2004); *Ferrimonas futtsuensis* и *Ferrimonas kyonanensis* (Nakagawa *et al.*, 2006); *Pelobacter seleniigenes* (Narasingarao & Haggblom, 2007); *Pantoea* sp. SSS2, *Klebsiella* sp. WRS2 и *Shigella* sp. DW2 (Zhang *et al.*, 2008); *Neisseria mucosa*, *Rahnella aquatilis*, и *Hafnia alvei* (Youssef *et al.*, 2009); и *Desulfurispirillum indicum* (Rauschenbach *et al.*, 2011).

1.2.2.3 Детоксификация

Детоксификация оксоанионов селена направлена на уменьшение токсичности этих веществ. Детоксификацию можно считать частным случаем диссимиляции, однако мы разделяем эти процессы, считая, что под детоксификацией следует понимать трансформацию соединений селена без получения энергии для бактериального роста. У бактерий существует две стратегии детоксификации таких соединений: метилирование и восстановление.

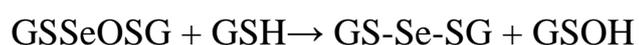
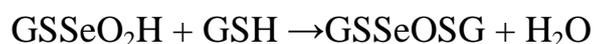
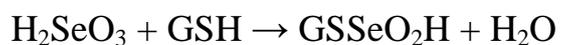
Самые распространенные метилированные формы селена – диметилселенид и диметилдиселенид. Эти соединения токсичны, но они удаляются из среды, так как являются летучими, позволяя бактериям избежать токсического эффекта. В обоих соединениях селен проявляет низшую степень окисления – Se^{-2} . У бактерий метилирование соединений селена чаще всего происходит в результате реакций, катализируемых метилтрансферазами (Ganther *et al.*, 1966). Микробная трансформация неорганических и органических форм селена до их метилированных форм впервые наблюдалась в опытах с озерной водой и донными отложениями (Chau *et al.*, 1976). *Rhodocyclus tenuis* и *Rhodospirillum rubrum* метилируют селенат до диметилселенида и диметилдиселенида в процессе фототрофного

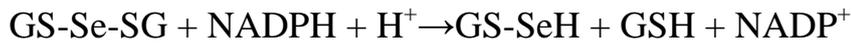
роста. *R. tenuis* способна к продукции диметилселенида также и из селенита (McCarty *et al.*, 1993). Один из ферментов, катализирующих этот процесс, – тиопуринметилтрансфераза. У бактерии *Pseudomonas syringae* она кодируется геном *tpm* (Ranjard *et al.*, 2002). Этот фермент участвует в трансформации селенита и Se-метил-селеноцистеина в диметилселенид и диметилдиселенид. Другой фермент является гомологом калихеамицинметилтрансферазы и кодируется геном *mmtA* (Ranjard *et al.*, 2004). В качестве субстратов этот фермент использует селенит и селеноцистеин. У многих бактерий имеются ферменты, гомологичные MmtA. Также было показано, что бактерии *P. stutzeri* NT-I способны трансформировать селенат, селенит и элементарный селен до диметилселенида и диметилдиселенида в аэробных условиях. Эти летучие соединения временно аккумулируются в водной фазе, а затем выводятся в газовую фазу (Kagami *et al.*, 2013).

Другой механизм, связанный с защитой бактерий от токсического действия селенитов, – восстановление селенита до Se⁰ тиолами (глутатионом, его функциональным аналогом у бактерий рода *Bacillus* – бациллитиолом или тиоредоксином) в цитоплазме, так называемые Painter-type reactions. Эти реакции были названы по фамилии исследователя, впервые показавшего возможность таких взаимодействий. Пэйнтер изучал реакции между селенит-ионами и тиолами с образованием селенотрисульфида (RS-Se-SR). Формирование этого соединения было подтверждено в опытах *in vivo* на клетках *E. coli*, инкубированных в присутствии селенита, содержащего изотоп ⁷⁷Se. Уравнение реакции приведено ниже (Painter, 1941):



Впоследствии, Гантер предположил возможность подобной реакции между селенитом и глутатионом (Ganther, 1968):

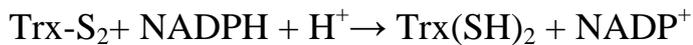




где GSSeO_2H – глутатионселенон, GSSeOSG – диглутатионселенон, GS-Se-SG – селенодиглутатион, GSSeH – L-гамма-глутамил-S-селанил-L-цистеинилглицин.

Было замечено, что у *E. coli* в присутствии селенита повышались концентрации восстановленных тиоредоксина и тиоредоксинредуктазы (Yamada *et al.*, 1997). В другом исследовании была показана индукция тиоредоксина у *Bacillus subtilis* (Garbisu *et al.*, 1996; Garbisu *et al.*, 1999). Тиоредоксины – небольшие белки, содержащие мотив, в котором рядом расположены два остатка цистеина. При помощи этих двух остатков, отдавая водород, они могут восстанавливать дисульфидные связи других белков, разрушая дисульфидные мостики. Затем тиоредоксинредуктаза, используя водород от НАДФ-Н, восстанавливает тиоредоксин. Восстановленный тиоредоксин может реагировать с селенодиглутатионом и селеноперсульфид-анионом. Элементарный селен высвобождается из селеноперсульфид-аниона.

Таким образом, восстановленный тиоредоксин и тиоредоксинредуктаза предположительно включены в восстановление селенита и селенодиглутатиона. Уравнения реакции следующие:



У *Pseudomonas seleniipraecipitans* восстановление селенита также предположительно связано с глутатионредуктазой или тиоредоксинредуктазой (Hunter, 2014). За восстановление селенита в *R. rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* и *B. subtilis* ответственны цитоплазматические тиолы (Garbisu *et al.*, 1999; Kessi & Hanselmann, 2004; Kessi, 2006). С использованием бутионинсульфоксимины (БСО), ингибитора γ -глутамилцистеинсинтетазы, предотвращающего синтез глутатиона, было показано, что восстановление селенита до элементарного селена бактерией

Pseudomonas maltophilia (на данный момент классифицированной как *Stenotrophomonas*) происходит с участием глутатиона (Blake *et al.*, 1993).

Восстановление до элементарного селена соединениями, содержащими тиоловые группы, считается основным механизмом детоксификации окисленных форм селена. Однако этот процесс может быть опосредован другими механизмами. В частности, в детоксификацию оксоанионов селена могут включаться различные ферменты. Например, этот процесс у селенатвосстанавливающей бактерии *E. cloacae* SLD1a-1 в анаэробных условиях катализируется нерастворимой в воде селенатредуктазой (Losi & Frankenberger, 1997). Селенатредуктаза *E. cloacae* SLD1a-1 является трансмембранным гетеротримером с общей массой ~600 кДа (Watts *et al.*, 2003). Было показано, что она содержит молибден и работает в периплазме. Этот фермент способен восстанавливать селенат до Se^0 с промежуточным продуктом в виде селенита. При этом восстановление селената не используется для дыхания этой бактерией, так что функцией данного фермента, очевидно, является детоксификация соединений селена (Ridley *et al.*, 2006).

В детоксификацию селенита бактериями могут включаться сидерофоры: для *P. stutzeri* КС было показано, что в процессе детоксификации селенита участвует сидерофор пиридин-2,6-бис(тиокарбокислотная кислота). При этом селенит восстанавливается до Se^0 (Zawadzka *et al.*, 2006).

Из *Tetrathio bacter kashmirensis* был выделен растворимый белок массой ~90 кДа с неизвестной функцией, который участвует в восстановлении селенита и нитрата, но не селената (Hunter & Manter, 2008). Периплазматическая нитритредуктаза у бактерий *T. selenatis*, *Rhizobium sullae* и *Rhizobium selenitireducens* участвует в восстановлении селенита до элементарного селена (DeMoll-Decker & Masy, 1993; Hunter *et al.*, 2007; Hunter & Kuyendall, 2007). У *B. selenitireducens* восстановление селенита предположительно осуществляется арсенатредуктазой (Afkar *et al.*, 2003).

Восстановление селенита также может происходить во внеклеточной среде за счет веществ, синтезируемыми бактериями в окружающую среду или цитохромами внешней мембраны. Сульфатдышащие и гетеротрофные бактерии продуцируют H_2S , который может химически реагировать с селенитом и продуцировать Se^0 (Barton & Fauque, 2009). В анаэробных условиях *S. oneidensis* способна восстанавливать селенит до Se^0 с участием флавиномононуклеотида и рибофлавина (von Canstein *et al.*, 2008; Marsili *et al.*, 2008). Цитохромы внешней мембраны *Shewanella* и *Geobacter* могут способствовать внеклеточному восстановлению селенита до Se^0 (Shi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014).

Сульфатвосстанавливающие бактерии могут получать энергию путем восстановления окисленных органических соединений серы в высоких степенях окисления (сульфаты, сульфиты, тиосульфаты) с образованием сульфида водорода (Muzyer & Stams, 2008; Barton & Fauque, 2009). Исходя из структурного подобия сульфата и селената, эти бактерии способны восстанавливать SeO_4^{2-} до Se^0 внутри клеток, как это показано для *Desulfovibrio desulfuricans* (Tomei *et al.*, 1995).

У *R. sphaeroides* за восстановление селенита предположительно отвечают некоторые шапероны, факторы элонгации и некоторые ферменты, ответственные за реакции окислительного стресса (Bebien *et al.*, 2001).

Таким образом, анализ литературных данных о метаболизме оксоанионов селена у бактерий показал, что пути их транспорта в клетку изучены не до конца: считается, что у большинства микроорганизмов эти соединения попадают в клетку посредством сульфат- и сульфат-тиосульфатпермеаз, а также могут существовать другие, неспецифические пути переноса соединений селена в клетку. Пути ассимиляции соединений селена у всех организмов одинаковы и представляют сложный энергетически затратный механизм. Несмотря на то, что синтез селеносодержащих белков более энергетически затратен, чем синтез их серосодержащих аналогов, у организмов фактически всех филогенетических групп, за исключением

дрожжей, грибов и растений, существует синтез селеносодержащих соединений, что говорит о важности селена для живых организмов. Диссимиляционный метаболизм связан с получением энергии из соединений селена. Подавляющее большинство микроорганизмов, способных получать энергию из селеносодержащих соединений, используют в качестве конечного акцептора электронов селенаты. Случаев использования энергии, полученной при восстановлении селенитов, для бактериального роста установлено не было. Одним из путей детоксификации является метилирование соединений селена. У бактерий может наблюдаться одновременно и восстановление оксоанионов селена, и метилирование. В основном восстановление селенита используется бактериями для избежания токсического действия этого оксоаниона.

1.3 Использование потенциала селенит-восстанавливающих бактерий в бионанотехнологии

Наночастицы обладают необычными электронно-оптическими свойствами, отличающимися от свойств объемных материалов, так как эти свойства меняются с уменьшением размера. Они обусловлены большей удельной поверхностью, поверхностной энергией и пространственным ограничением частицы. Таким образом, использование Se-НЧ вместо других форм селена позволяет получать выгоду не только от характерных для селена эффектов (например, полупроводимости), но и от новых свойств, обусловленных его коллоидной формой (например, “растворимостью” при нулевой степени окисления, большей удельной площадью поверхности частицы и т.д.). В литературе активно обсуждается возможность использования бактериально синтезированных наночастиц в медицине и технике: в составе фотокатализаторов, сенсоров, выпрямителей и солнечных батарей (Shirsat *et al.*, 2015; Wadhvani *et al.*, 2016).

Существует множество методов получения Se-НЧ: восстановление окисленных форм селена различными восстановителями, лазерная абляция,

фотокаталитический синтез и т.д. Отдельного упоминания заслуживает биологический метод синтеза Se-НЧ с использованием способности бактерий к восстановлению различных соединений селена (в частности, селенита) до Se^0 . Этот метод относится к «зеленой химии». «Зеленую химию» определяют как любые усовершенствования процессов получения химических продуктов, уменьшающих или полностью предотвращающих возникновение опасных продуктов при производстве и использовании химических веществ (Anastas & Kirchoff, 2002). Она базируется на 12 принципах (Anastas & Warner, 1998), представляющих собой практические подходы, позволяющие химии отвечать вызовам концепции устойчивого развития. Бактериальный синтез селеновых наночастиц – легкий, безопасный, биосовместимый и экологически чистый метод получения наночастиц. Синтезированные таким способом Se-НЧ имеют уникальные свойства, отличные от свойств химически синтезированных наночастиц. Например, с помощью селендышащих бактерий *S. barnesii*, *B. selenitireducens* и *Selenihalanaerobacter shriftii* были получены Se-НЧ, структурно отличные от химически синтезированных (Oremland *et al.*, 2004).

Следует отметить, что синтезированные с помощью бактерий Se-НЧ часто содержат в своем составе биологические макромолекулы, обеспечивающие коллоидным суспензиям стабильность (Tugarova & Kamnev, 2017). Вероятно, это связано с высокой адсорбирующей способностью селеновых наночастиц при их взаимодействии с различными группами в составе таких молекул: NH, C=O, COO⁻ и C–N (Jia *et al.*, 2005; Shi&Li, 2012).

К синтезу Se-НЧ способно огромное количество различных видов бактерий (табл. 2). При этом Se-НЧ могут находиться как внутри бактериальных клеток, так и экстраклеточно. Разнообразие свойств таких Se-НЧ обуславливается многообразием ферментов, участвующих в их синтезе. На свойства Se-НЧ можно влиять, изменяя условия синтеза (температуры, pH и другие). Было показано, что размер Se-НЧ, полученных с помощью *Shewanella* sp. HN-41, зависит от таких параметров, как исходная плотность культуры, концентрация селенита и время роста культуры (Tam *et al.*, 2010).

Таблица 2 – Бактерии, способные к синтезу наночастиц Se(0)

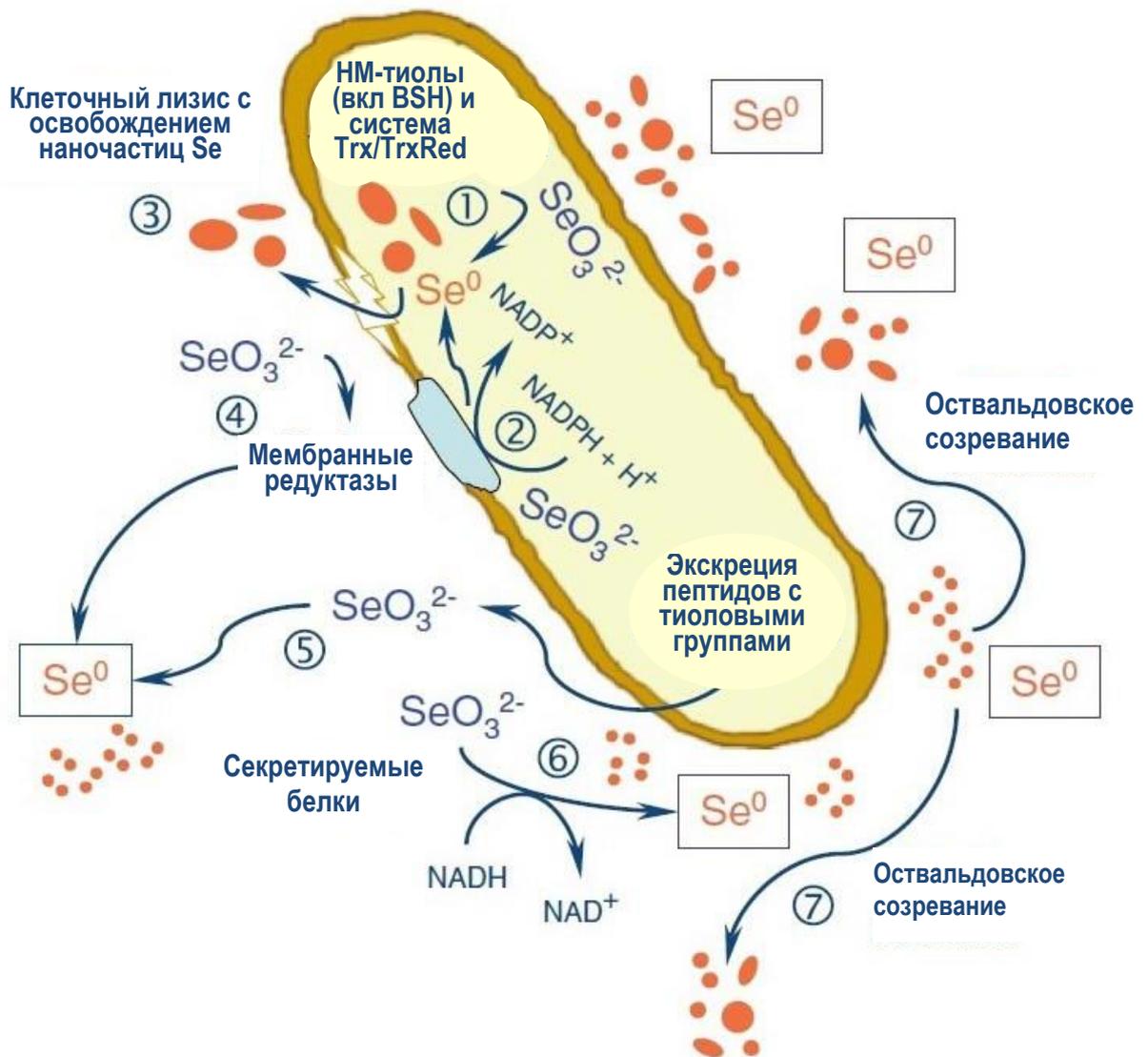
Бактерия	Локализация	Форма селена	Ссылка
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Внеклеточно и внутриклеточно	Аморфный	(Yadav <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. subtilis</i>	Внеклеточно	Моноклинный	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	Внеклеточно	Аморфный	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Zooglea ramigera</i>	Внеклеточно	Кристаллический, гексагональный	Srivastava & Mukhopadhyay 2013
<i>D. indicum sp. S5</i>	Внутриклеточно	–	Rauschenbach <i>et al.</i> , 2011
<i>Deferribacteres S7</i>	Внеклеточно, связаны с поверхностью	–	Narasingarao & Häggblom, 2007
<i>P. seleniigenes KM7</i>	Внеклеточно, связаны с поверхностью	–	– // –
<i>P. stutzeri pn1</i>	Внутриклеточно	–	– // –
<i>Geobacter sulfurreducens PCA</i>	Внеклеточно	Аморфный	Pearce <i>et al.</i> , 2009
<i>S. oneidensis</i>	Внеклеточно, на поверхности	Аморфный	– // –
<i>Veillonella atypica</i>	Внеклеточно, на поверхности	Аморфный	– // –
<i>R. rubrum</i>	Внутриклеточно	Аморфный	Kessi <i>et al.</i> , 1999
<i>S. shriftii</i>	Внеклеточно, внутриклеточно	Моноклинный	Oremland <i>et al.</i> , 2004
<i>B. selenitireducens</i>	Внеклеточно, внутриклеточно	Моноклинный	– // –
<i>S. barnesii</i>	Внеклеточно, внутриклеточно	Моноклинный	– // –
<i>Shewanella sp. HN-41</i>	Внеклеточно, на внешней мембране	Аморфный	Tam <i>et al.</i> , 2010
<i>S. oneidensis MR-1</i>	Внутриклеточно	–	Li & Cheng, 2014
<i>T. selenatis</i>	Внутриклеточно и внеклеточно	–	Debieux <i>et al.</i> , 2011
<i>V. atypica</i>	Внутриклеточно, внеклеточно	Аморфный	Pearce <i>et al.</i> , 2008

Продолжение таблицы 2

<i>S. maltophilia</i>	Внеклеточно	Аморфный	Dungan <i>et al.</i> , 2003
<i>E. taylorae</i>	Внеклеточно	–	Zahir <i>et al.</i> , 2003
<i>E. cloacae</i>	Внеклеточно	–	Losi & Frankenberger 1997
<i>R. rubrum</i>	Внутриклеточно	–	Kessi <i>et al.</i> , 1999
<i>B. arsenicoselenatis</i>	–	–	Switzer-Blum <i>et al.</i> 1998
<i>B. selenitireducens</i>	–	–	Switzer-Blum <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus cereus</i>	Внутриклеточно и внеклеточно	–	Dhanjal & Cameotra
<i>Shewanella</i> sp. HN-41	–	Аморфный	Tam <i>et al.</i> 2010
<i>Duganella</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp.	–	–	Bajaj & Schmidt, 2012
<i>T. kashmirensis</i> CA1	Внеклеточно	Аморфный	Hunter & Manter, 2008
<i>Bacillus megaterium</i>	Внеклеточно	Кристаллический	Mishra <i>et al.</i> , 2011
<i>E. coli</i>	–	Аморфный	Dobias <i>et al.</i> , 2011

"–" – нет данных.

Механизмы процесса синтеза и формирования Se-НЧ до конца не выяснены, несмотря на их активное исследование. Синтез Se-НЧ бактериями возможен благодаря процессам восстановления оксоанинов, происходящим у бактерий с помощью различных механизмов (рис. 4). При этом бактериальное восстановление селенит-ионов может происходить как внутриклеточно, с участием глутатиона, системы тиоредоксина, внутриклеточных и мембранных редуктаз, шаперонов, сидерофоров и др., так и внеклеточно. Синтезируемые Se-НЧ могут обнаруживаться как внутри, так и вне бактериальных клеток.



1 – Цитозольное восстановление аниона SeO_3^{2-} в виде наночастиц Se^0 , связанное с активностью низкомолекулярных тиолов (включая бациллитиол) или системы тиоредоксин/тиоредоксинредуктаза; 2 – внутриклеточное восстановление селенита и формирование Se-НЧ в результате активности мембранных редуктаз; 3 – освобождение внутриклеточно синтезированных наночастиц в результате лизиса клетки; 4 – экстраклеточное восстановление мембранными редуктазами; 5 – экстраклеточные пептиды и другие соединения, содержащие тиоловые группы, непосредственно реагирующие с селенитом; 6 – экстраклеточное формирование селеновых наночастиц в присутствии внеклеточных белков, восстанавливающих селенит только при наличии восстановительных эквивалентов (НАДН); 7 – рост новообразованных Se-НЧ для достижения стабильного состояния по механизму Оствальдовского созревания.

Рисунок 4 – Обобщенная схема предполагаемых механизмов биосинтеза селеновых наночастиц для *B. mycoides* SelTE01 (Lampis *et al.*, 2014)

Следует отметить, что наночастицы могут быть обнаружены во внеклеточной среде и при внутриклеточной сборке наночастиц в результате лизиса клеток и выхода наночастиц через поврежденную оболочку. Механизм сборки Se-НЧ до сих пор до конца не понятен. Предполагают, что он происходит в результате физико-химических процессов, таких как Оствальдовское созревание (Srivastava & Mukhopadhyay, 2016). С другой стороны, нельзя исключить участие в сборке Se-НЧ различных биологических молекул, служащих определенной матрицей для формирования наночастиц и стабилизирующие их (Debieux *et al.*, 2011; Dobias *et al.*, 2011; Tugarova & Kamnev, 2017). Se-НЧ, синтезированные бактерией *T. selenatis*, содержали в своем составе белок с молекулярной массой 95 кДа, который был выделен и охарактеризован. Он был назван SefA (Se factor A). Предполагается, что этот белок участвует в процессе стабилизации селеновых наночастиц и препятствует их агрегации (Debieux *et al.*, 2011). Для *Bacillus mycoides* SelTE01 предложена обобщающая схема возможных путей синтеза Se-НЧ. В качестве возможного механизма сборки авторы предполагают Оствальдовское созревание.

Большая часть практических исследований биологически синтезированных Se-НЧ направлена на их медицинское применение. Например, было показано, что Se-НЧ, полученные с помощью *Bacillus licheniformis* JS2, ингибируют пролиферацию и вызывают некроз клеток аденокарциномы простаты, не показывая токсического действия для клеток крови (Sonkusre *et al.*, 2014). Se-НЧ, синтезированные с использованием *Idiomarina* sp. PR58-8, также проявляют противоопухолевую активность и не влияют на нормальные клетки (Srivastava & Kowshik, 2016). Se-НЧ, выделенные из *Bacillus oryzae* ZYK^T, ингибируют рост клеток культуры карциномы H157 (Bao *et al.*, 2016). Другой вид, *Bacillus* sp. MSh-1, также способен к синтезу Se-НЧ, проявляющих токсическое действие в отношении *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* (Shakibaie *et al.*, 2015) и *Leishmania major* (Beheshti *et al.*, 2013). Se-НЧ, полученные с помощью *R.*

eutropha, показывают антибактериальную активность против *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *Streptococcus pyogenes*, а также ингибируют рост патогенного гриба *Aspergillus clavatus* (Srivastava & Mukhopadhyay, 2015). Антибактериальной активностью в отношении как планктонных культур, так и биопленок *E. coli* JM109, *P. aeruginosa* PAO1 и *S. aureus* ATCC 25923 обладают Se-НЧ, полученные с помощью *S. maltophilia* SeITE02 (Zonaro *et al.*, 2015). Se-НЧ из *Streptomyces minutiscleroticus* M10A62 проявляют антиоксидантную, антивирусную, антибактериальную, ранозаживляющую активность. Показано их антипролиферативное действие в отношении культур клеток HeLa и HepG2 (Ramya *et al.*, 2015). Выделенные из *Mycobacterium bovis* Se-НЧ увеличивали иммунный ответ в отношении гепатита В на мышинной модели (Mavandadnejad *et al.*, 2017). Se-НЧ, полученные из *Rhodopseudomonas palustris*, имели гепатопротекторный эффект (Li *et al.*, 2017). При использовании Se-НЧ в качестве пищевых добавок в некоторых случаях не требуется очистка. Например, лактобактерии *Lactobacillus brevis*, содержащие внутриклеточные Se-НЧ, обладали иммуностимулирующим действием, продлевая срок жизни больных раком мышей при пероральном введении (Yazdi *et al.*, 2013). В другом исследовании лактобактерии использовались для получения обогащенного селеном йогурта (Eszenyi *et al.*, 2011).

Потенциал бактерий в восстановлении селенит-ионов может использоваться для биоремедиации загрязненных селеном вод и почвы (Lenz *et al.*, 2009; Buchs *et al.*, 2013; Nancharaiah & Lens, 2015). Помимо этого, было показано использование бактериально синтезированных Se-НЧ для создания биосенсоров. Например, выделенные из *B. subtilis* Se-НЧ были конъюгированы с пероксидазой хрена для создания биосенсора H₂O₂ (Wang *et al.*, 2010). Недавние исследования показали, что наноразмерные полупроводниковые материалы на основе селена (так называемые квантовые точки, quantum dots) также могут быть синтезированы с использованием микроорганизмов (Pearce *et al.*, 2008; Fellowes *et al.*, 2013).

Использование бактерий в качестве клеточных фабрик для производства Se-НЧ – область, приобретающая важное значение в настоящее время. Полученные таким способом Se-НЧ находят применение в самых различных областях, включая медицину и пищевую индустрию. Изучение механизмов бактериального восстановления важно для контроля параметров получаемых Se-НЧ и для разработки методик получения Se-НЧ с помощью бактерий, улучшения и масштабирования процессов производства наночастиц.

1.4 Влияние оксоанионов селена на *Azospirillum brasilense*

Бактерии рода *Azospirillum* – широко распространенные α -протеобактерии. Благодаря своему большому геному они имеют высокий адаптивный потенциал. Азоспириллы занимают различные экологические ниши практически во всех климатических зонах и способны адаптироваться к различным стрессовым факторам (Kamnev, 2008; Kamnev *et al.*, 2008), в том числе к тяжелым металлам (Kamnev *et al.*, 2006; Kamnev *et al.*, 2012).

Отдельные виды азоспирилл являются почвенными ризосферными микроорганизмами, способными колонизировать множество различных видов растений и значительно улучшать их рост, развитие и продуктивность в полевых условиях (Bashan & de-Bashan, 2010; Hungria *et al.*, 2010; Fukami *et al.*, 2016; Pereg *et al.*, 2016; Fukami *et al.*, 2018). На данный момент бактерии видов *Azospirillum brasilense* и, в меньшей степени, *Azospirillum lipoferum* являются одними из наиболее изученных и коммерчески используемых микроорганизмов среди PGPB (plant growth promoting bacteria – бактерий, стимулирующих рост растений). Было показано, что использование этих азоспирилл может быть полезно для био- и фиторемедиации, а также для более полного удаления токсичных поллютантов (Bashan *et al.*, 2004; Belimov & Dietz, 2000; de-Bashan *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 1999; Муратова с соавт., 2005, 2010; Huang *et al.*, 2004, Lucy *et al.*, 2004).

До начала настоящего исследования данных по влиянию оксоанионов селена на бактерии рода *Azospirillum* было немного. Впервые способность азоспирилл к восстановлению селенитов (но не селенатов) была показана в 2013–2014 гг. (Тугарова с соавт., 2013; Tugarova *et al.*, 2014). В работе использовались два штамма *A. brasilense*, Sp7 и Sp245, различающиеся занимаемыми экологическими нишами: *A. brasilense* Sp245 является эндофитом и способен проникать внутрь растительного корня, а *A. brasilense* Sp7 – эпифит, способный колонизировать только внешнюю поверхность корня (Schloter & Hartmann, 1998). Минимальная ингибирующая рост концентрация (МИК) селената и селенита точно определена не была, для обоих веществ она находилась в пределах 0,08–0,3 мМ. При продлении культивирования бактериальных культур до 7 сут в присутствии селенита (до 1 мМ) наблюдалось красное окрашивание бактериальных суспензий, связанное с восстановлением селенита до элементарного селена в красной модификации. Аналогичный эффект был зафиксирован при выращивании азоспирилл в статичных условиях культивирования на твердой среде. При концентрации 10 мМ рост азоспириллы не наблюдался на протяжении всего эксперимента (до 30 сут) (Tugarova *et al.*, 2014). При выращивании на твердой среде наблюдалось красное окрашивание бактериальных колоний без окрашивания прилегающих областей, что свидетельствует о связи красного окрашивания именно с клетками и вероятной локализации ферментов, восстанавливающих селенит натрия до элементарного селена, внутри клеток. Это предположение было подтверждено просвечивающей электронной микроскопией (ПЭМ), показавшей наличие электроноплотных включений сферической формы диаметром 50–400 нм преимущественно внутри бактериальных клеток. С помощью спектроскопии энергетических потерь электронов было доказано, что они содержали селен. Результаты рентгенофлуоресцентного анализа показали значительное накопление селена в бактериальной биомассе, росшей в присутствии селенита. Азоспириллы были неспособны к трансформации селената.

Известно, что за процесс восстановления селенит-ионов бактериями могут отвечать нитрит- и нитратредуктазы. Для азоспирилл были описаны гены, отвечающие за метаболизм азота. Среди этих последовательностей были найдены гены нитрит- и нитратредуктазы (Bashan *et al.*, 2004). Предполагалось, что за внутриклеточное восстановление у азоспирилл могут отвечать нитрит- или нитратредуктазы, так как они локализованы внутри клеток (Tugarova *et al.*, 2014).

В более поздних исследованиях было изучено восстановление селенита штаммом *A. brasilense* Cd. Данные по токсичности селенита для этого штамма хорошо согласуются с результатами, полученными для *A. brasilense* Sp7 и Sp245. Рост ингибировался до 42 ч при концентрации селенита до 1 мМ, в присутствии 10 мМ рост полностью отсутствовал (Vogel *et al.*, 2018). Авторы с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показали, что Se-НЧ при росте штамма *A. brasilense* Cd локализованы экстраклеточно. Следует отметить, что нахождение Se-НЧ вне бактериальных клеток не обязательно связано с их внеклеточным формированием. Они могут присутствовать также и внутри бактериальных клеток, однако определить присутствие Se-НЧ внутри клеток методом СЭМ невозможно. Высказано предположение, что ферментативные реакции, приводящие к восстановлению селенита и образованию Se-НЧ, могут происходить вне клеток, вблизи клеточной поверхности. Также не исключается, что процессы восстановления могут происходить внутри клеток с образованием наночастиц диаметром менее 100 нм, которые затем могут выноситься за пределы клеток и образовывать более крупные Se-НЧ (Vogel *et al.*, 2018).

Методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии было показано, что клетки *A. brasilense* Cd были способны восстанавливать селенит в присутствии высоких концентраций сульфата с образованием наночастиц, состоящих из Se и S. Спектроскопия комбинационного рассеяния (СКР) наночастиц подтвердила, что наночастицы, полученные с

использованием *A. brasilense* Cd, состоят из серы и селена и имеют в составе структуры Se_6S_2 .

Для определения степени окисления Se в составе наночастиц было проведена рентгеновская абсорбционная спектроскопия. Полученные данные указывают на нулевую степень окисления Se в составе Se-НЧ, а также свидетельствуют о возможном замещении Se на S в типичных для аморфной модификации кольцах Se_8 (Vogel *et al.*, 2018). Также они показывают, что включение серы в состав наночастиц зависит от доступной для бактерий концентрации сульфата в среде.

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что бактерии рода *Azospirillum* способны минимизировать токсическое действие селенит-ионов благодаря способности к их восстановлению. Данный процесс проходит с образованием Se-НЧ. Механизмы восстановления у азоспирилл на данный момент не описаны и требуют изучения. Способность к синтезу Se-НЧ, вероятно, может быть использована в биотехнологии. Также можно полагать, что азоспириллы будут полезны при использовании в биоремедиации для очистки сточных вод производств и загрязненных селеном почв.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Использованные в работе бактерии были получены из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (wdc.m 1021, www.collection.ibppm.ru). Информация об используемых штаммах азоспирилл приведена в табл. 3.

Таблица 3 – Штаммы азоспирилл, использованные в работе, и их происхождение

Штамм	Характеристика	Ссылка
<i>A. brasilense</i> Sp7 (ATCC 29145)	Росичка простертая (лежачая) (<i>Digitaria decumbens</i>)	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>A. brasilense</i> Sp7.1	Производный Sp7-S с R-морфологией колоний; содержит плазмиды с молекулярной массой 124 и более 300 МДа	Петрова с соавт., 2005; Кацы и Петрова 2015
<i>A. brasilense</i> Sp7.3	Производный Sp7-S с R-морфологией колоний; содержит плазмиды с молекулярной массой 121 и более 300 МДа	Петрова с соавт., 2005; Кацы и Петрова 2015
<i>A. brasilense</i> Sp7.4	Производный Sp7-S с R-морфологией колоний; содержит плазмиды с молекулярной массой 131 и более 300 МДа	Петрова с соавт., 2005; Кацы и Петрова 2015
<i>A. brasilense</i> Sp245	Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	Baldani <i>et al.</i> , 1983
<i>A. lipoferum</i> Sp59b	Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>A. halopraeferens</i> Au4	Лептохлюя рыжая (<i>Leptochloa fusca</i> (L.) Kunth))	Reinhold <i>et al.</i> , 1987
<i>A. thiophilum</i> BV-S (DSM 21654)	Серосодержащий минеральный источник	Lavrinenko <i>et al.</i> , 2010
<i>A. zeaе</i> N7	Ризосфера кукурузы (<i>Zea mays</i>)	Mehnaz <i>et al.</i> , 2007
<i>A. formosense</i> CC-Nfb-7	Сельскохозяйственные почвы, уезд Юньлинь, Тайвань	Lin <i>et al.</i> , 2012
<i>A. palatum</i> ww 10	Лесная почва провинции Чжэцзян, Китай	Zhou <i>et al.</i> , 2009
<i>A. picis</i> IMMIB TAR-3	Отработанный гудрон (discarded road tar) города Тайчжун, Тайвань	Lin <i>et al.</i> , 2009

Производные штамма *A. brasilense* Sp7 с различиями в скорости нитритредукции, *A. brasilense* Sp7.1, *A. brasilense* Sp7.3 и *A. brasilense* Sp7.4, были предоставлены сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН. Также в работе был использован штамм *E. coli* K-12.

2.2 Среды для культивирования бактерий

Культивирование азоспирилл производилось на синтетической малатной среде (СМС), предложенной Доберейнер и Дэй (Döbereiner & Day, 1976), модифицированной до следующего состава (г/л): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 3,0; KH_2PO_4 – 2,0; $NaCl$ – 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; $CaCl_2$ – 0,02; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,02; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,002; яблочная кислота – 3,76; $NaOH$ – 2,24; NH_4Cl – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,1.

Для штамма *A. halopraeferens* Au4 содержание $NaCl$ в среде составляло 5 г/л. Величину pH среды до нужного диапазона (6,8–7,0) доводили 10 М раствором $NaOH$ перед автоклавированием. Соли $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CaCl_2$ были приготовлены в виде стоковых 500-кратных стерильных растворов, которые добавляли в среду культивирования после автоклавирования последней. Железо в среду вносили в хелатной форме из расчета 10 мл раствора на литр среды перед автоклавированием. Раствор хелатного железа содержал, г/л: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2,0; нитрилотриуксусная кислота – 5,6.

E. coli K-12 выращивали на среде LB, содержащей (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; $NaCl$ – 5 (Bertani, 1951).

Все среды стерилизовали в течение 30 мин при 121°C.

Инокулят для экспериментов выращивали в периодической культуре. Если не указано иное, выращивание происходило при 28–31°C (для *A. halopraeferens* Au4 и *E. coli* K-12 при 37°C) аэробно на качалке при 140–200 об./мин, в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих по 100 мл среды, в течение 18–22 ч.

Селенит, приготовленный в виде 500 мМ раствора, добавлялся до нужной концентрации после автоклавирования сред.

Контроль чистоты культур осуществлялся методом раздавленной капли на световом микроскопе (Olympus C011, Япония; 400-кратное увеличение). Плотность культур определяли с помощью спектрофотометра (Spekol 221, Германия; $\lambda = 595$ нм). ОП, равная 1, соответствует 4×10^9 кл./мл. ОП выращенного инокулята составляла 0,7–1.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Определение токсичности и восстановления селенита натрия

Для определения токсичности культуры *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245, *A. halopraeferens* Au4, *A. lipoferum* Sp59b, *A. formosense* CC-Nfb-7, *A. palatum* ww 10, *A. picis* IMMIB TAR-3, *A. thiophilum* BV-S и *A. zeae* N7 выращивали на жидкой среде СМС в колбах Эрленмейера объемом 50 мл с 20 мл среды. Инокулят был выращен, как описано в разделе 2.2. Объем вносимого инокулята зависел от его ОП и рассчитывался таким образом, чтобы плотность бактериальной культуры на начало эксперимента составляла 2×10^7 кл./мл. Бактерии выращивали аэробно на качалке при 140–200 об./мин без (контроль) или в присутствии Na_2SeO_3 в диапазоне концентраций 0,05–5 мМ (эксперимент). Ингибирующие концентрации Na_2SeO_3 определяли по уменьшению оптической плотности (ОП) на 18–20 ч роста. В каждом варианте было взято не менее 3 повторностей.

Для *A. halopraeferens* Au4, *A. lipoferum* Sp59b, *A. formosense* CC-Nfb-7, *A. palatum* ww 10, *A. picis* IMMIB TAR-3, *A. thiophilum* BV-S и *A. zeae* N7 были исследованы концентрации в диапазоне 0,05–5 мМ Na_2SeO_3 . Для *A. thiophilum* BV-S диапазон концентраций Na_2SeO_3 был расширен до 15 мМ. Исследуемые штаммы культивировали в течение 7 сут при 28–31°C в аэробных (качалка, 180 об./мин) условиях. *A. halopraeferens* Au4 выращивали при 37°C. Восстановление селенита фиксировали по изменению окраски клеточных культур: появление различных оттенков красного цвета свидетельствовало о присутствии в среде Se^0 .

2.3.2 Восстановление селенит-ионов производными штамма

A. brasilense Sp7, различающимися по скорости нитритредукции

Для сравнения восстановления селенита инокуляты штамма *A. brasilense* Sp7 и его производных *A. brasilense* Sp7.1, *A. brasilense* Sp 7.3, *A. brasilense* Sp7.4 были выращены, как описано в разделе 2.2. Далее культуры переносили на свежую СМС и выращивали в течение 18 ч в тех

же самых условиях. После этого суспензии были доведены до одинаковой ОП (~0,8), трижды отмыты и ресуспендированы в четверти начального объема стерильного физиологического раствора (ФР).

Восстановление селенит-ионов исследовали следующим образом: к бактериальным суспензиям добавляли Na_2SeO_3 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. После этого образцы суспензий были исследованы с помощью ПЭМ.

Восстановление нитрит-ионов исследовали с использованием реактива Грисса (Nicolas & Nason, 1957). К суспензиям добавляли NaNO_2 до конечной концентрации 1,5 мкг/мл. Полученные суспензии были помещены в термостат при 32°C. Убывание концентрации нитрит-ионов в надосадке отслеживали каждый час в течение 6 ч. Для этого клетки осаждали центрифугированием при 12000g в течение 5 мин, 100 мкл надосадка отбирали в лунки 96-луночного полистиролового планшета, добавляли 100 мкл реактива Грисса, инкубировали в течение 30 мин, а затем измеряли ОП суспензий при 532 нм (Nicolas & Nason, 1957). Количество нитрита в пробе определяли с помощью калибровочной прямой, построенной с использованием раствора NaNO_2 в ФР в диапазоне концентраций 0,003–1,5 мкг/мл. Реактив Грисса получали смешиванием в равной пропорции растворов 1 и 2. Раствор 1 содержал 0,5 г сульфаниловой кислоты в 150 мл 12% уксусной кислоты. Раствор 2 – 0,1 г α -нафтиламина в 20 мл воды и 150 мл 12% уксусной кислоты.

2.3.3 Ингибирование протондвижущей силы

В работе был использован ингибитор протондвижущей силы карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон (КЦХФ). Штаммы *A. brasilense* Sp245 и Sp7 были выращены согласно разделу 2.2. ОП культур была доведена до 1 с помощью стерильного ФР. Клетки были осажжены центрифугированием 15 мин при 3835g и трижды отмыты стерильным ФР.

Осадок был ресуспендирован в четверти начального объема стерильного ФР. К суспензии добавляли КЦХФ в диапазоне концентраций 5–50 мкМ. Как было показано ранее, данные концентрации КЦХФ полностью ингибируют протон-зависимый транспорт у *A. brasilense* Sp245 (Shelud'ko *et al.*, 2012). После инкубации в течение 30 мин суспензия была поделена на две части. Клетки в первой части были отмыты от КЦХФ (трижды) и ресуспендированы в стерильном ФР. Во второй – клетки не отмывались. К суспензиям был добавлен Na_2SeO_3 в диапазоне концентраций 10–25 мМ, после чего они были помещены в термостат при 32°C на 24 ч. В качестве контролей были использованы бактериальные клетки: (1) без добавления КЦХФ и селенита; (2) с добавлением КЦХФ; (3) с добавлением Na_2SeO_3 , а также (4) раствор 50 мкМ КЦХФ в ФР с добавлением 25 мМ Na_2SeO_3 . После инкубации клеточные суспензии исследовали с использованием ПЭМ.

2.3.4 Ингибирование синтеза глутатиона

В работе был использован ингибитор синтеза глутатиона БСО. Инокулят *A. brasilense* Sp7 был выращен, как описано в разделе 2.2. Далее восстановление селенита бактериями в присутствии БСО было исследовано: (1) при выращивании в аэробных условиях в течение 7 сут и (2) при инкубации клеток в ФР в течение 24 ч.

1. Культуру выращивали на жидкой среде СМС в колбах Эрленмейера объемом 50 мл с 20 мл среды. Бактерии выращивали при 32°C в термостатируемой качалке при 140 об./мин. В опыте были следующие варианты (в каждом – 3 повторности): (1) контроль – выращивание без БСО и Na_2SeO_3 ; (2) выращивание с 2 мМ БСО; (3) выращивание с 2 мМ БСО и 2 мМ Na_2SeO_3 ; (4) культура с добавлением 2 мМ Na_2SeO_3 . Начальная плотность культуры во всех вариантах составляла 2×10^7 кл./мл. ОП суспензий измеряли в первые сутки после 18, 20, 22 и 24 ч, и далее каждые сутки до 5 сут роста. После 7 сут роста выросшие культуры были исследованы с помощью ПЭМ.

2. Для инкубации клетки выращивали, как описано в п. 2.2. Клетки были собраны центрифугированием при 3835g в течение 10 мин, трижды отмыты при том же режиме и ресуспендированы в половине или четверти начального объема ФР. К полученным клеточным суспензиям добавляли БСО до конечных концентраций 1, 2 и 5 мМ, а также 100 мМ Na₂SeO₃. В качестве контроля использовали: (1) ФР, содержащий 5 мМ БСО и 100 мМ селенита; (2) отмытые клетки без добавления БСО и селенита; (3) культуру, не обработанную БСО с добавлением 100 мМ Na₂SeO₃. Далее образцы были поставлены в термостат и инкубировались при 32°C в течение 24 ч. По истечении 24 ч все варианты опыта были исследованы с использованием ПЭМ.

2.3.5 Получение наночастиц селена с использованием бактерий рода *Azospirillum*

Для получения Se-НЧ инокуляты штаммов *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245 и *A. thiophilum* BV-S выращивали, как описано в разделе 2.2. Далее бактерии пересеивали на свежую СМС и выращивали в течение 18–20 ч при тех же условиях. Для стандартизации количества клеток в суспензии культуры, ОП которых при росте превышала значение 1,0, разводили до ОП = 1,0 стерильным ФР. Клетки осаждали центрифугированием 10–15 мин при 3835g и трижды отмывали стерильным ФР от компонентов среды в том же режиме. Осадок был ресуспендирован в стерильном ФР. Все дальнейшие манипуляции производили в стерильных условиях.

Для оптимизации условий синтез Se-НЧ проводили: (1) с Na₂SeO₃ в диапазоне концентраций 1–100 мМ; (2) с бактериальными суспензиями с различным количеством клеток: сконцентрированные в 2, 4 и 8 раз; (3) в различных растворах: ФР, буферных растворах по Макилвейну с pH 3–7, фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с pH 7,3. Инкубацию проводили в термостате при 32°C. Для подбора оптимального времени был проведен мониторинг синтеза Se-НЧ в течение 24 ч с использованием ПЭМ. В ходе мониторинга оценивалась также скорость и интенсивность окрашивания суспензий.

По истечении времени инкубации клетки осаждали центрифугированием. Режимы центрифугирования, используемые для отделения клеток от Se-НЧ, подбирались так, чтобы максимальное количество клеток было осаждено, но при этом супернатант оставался окрашенным (наночастицы находились в суспензии, а не осаждались вместе с клетками). Скорость центрифугирования составляла от 100g до 7000g, время от 5 мин до 1 ч. Надосадоk отбирали и пропускали через одноразовые шприцевые фильтры из различных материалов с величиной пор 0,22 или 0,45 мкм. Использовали микронные фильтры с мембранами из поливинилиденфторида (ПВДФ), полиэфирсульфона (ПЭС) и ацетата целлюлозы (АЦ). Полученные суспензии Se-НЧ осаждали центрифугированием (30 мин, 12000g). Осадоk отмывали деионизированной водой в том же режиме и ресуспендировали в минимальном объеме (50–100 мкл) деионизированной воды. Количество отмывок варьировалось от 1 до 3.

2.3.6 Выделение белков клеточной поверхности, внешней мембраны и периплазмы *A. brasilense* Sp7

Инокулят штамма *A. brasilense* Sp7 был выращен, как описано в п. 2.2. Далее бактерии выращивали в течение 7 сут в 50 мл колбах Эрленмейера с 20 мл СМС без (контроль) и с добавлением Na_2SeO_3 в диапазоне концентраций 0,05–5 мМ (опыт). Начальная концентрация клеток составляла 2×10^7 кл./мл.

Для выделения белков клеточной поверхности, внешней мембраны и периплазмы 1,5 мл бактериальной культуры было осаждено центрифугированием 4 мин при 12000g, далее осадоk был дважды отмыт в том же режиме с использованием ФСБ (рН 7). Осадоk был ресуспендирован в 200 мкл экстрагирующего буфера следующего состава (на 10 мл): Трис – 120 мг; ЭДТА – 37 мг; фенилметилсульфонилфторид (2% в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) – 8,7 мкл; Triton X-100 – 100 мкл (рН 8,05 – 8,5). Суспензия была инкубирована при комнатной температуре 30 мин, а затем клетки были осажжены центрифугированием в течение 15 мин при 12000g. Надосадоk (белки) был отобран в пробирки Эппендорфа.

2.3.7 Выделение белков с поверхности наночастиц селена

Se-НЧ получали с помощью культур штаммов *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S. Инокуляты *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S были выращены в течение 18 ч в жидкой среде Доберейнер (п. 2.2). Культуры выращивались в тех же условиях в течение 18 ч (начальная плотность клеток – 4×10^7 кл./мл), после чего бактериальные клетки были собраны центрифугированием при 3835g в течении 10 мин и отмыты трижды в стерильном ФР в том же режиме. После этого клетки были ресуспендированы в четверти начального объема стерильного ФР. К полученным бактериальным суспензиям добавляли Na_2SeO_3 до конечной концентрации 5 мМ. Далее суспензии инкубировали в течение 24 ч при 31°C. По истечении времени инкубации клетки были осаждены центрифугированием при 1500g в течение 30 мин, надосадок был профильтрован через шприцевый фильтр с мембраной из ПВДФ (размер пор – 0,45 мкм). Полученная суспензия была центрифугирована при 12000g в течение 30 минут. Осадок (Se-НЧ) был отмыт в деионизированной воде в течение 30 мин при 12000g.

Для получения белков полученные Se-НЧ были ресуспендированы в 2 мл буферов следующего состава: сахароза – 0,5 М; ЭДТА – 3 мМ; Трис/НСl рН 8,0 – 100 мМ или следующего состава: Трис/НСl рН 8,0 – 0,1М; натрия додецилсульфат (ДСН) – 10%. Se-НЧ трижды обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин. Далее они были осаждены центрифугированием (30 мин, 12000g). Надосадок (белки) был отобран в пробирки Эппендорфа.

2.3.8 Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили на пластинах полиакриламидного геля (ПААГ) в присутствии ДСН по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Концентрация акриламида в разделяющем геле составляла 12,5%. Гели окрашивали 0,04% раствором кумасси R-250 или нитратом серебра.

Концентрация белка в исследуемых образцах была определена по модифицированному методу Бредфорда (Bradford, 1976). Концентрация

определялась по калибровочной прямой, построенной с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА).

2.3.9 Иммунохимическое исследование

Для определения наличия в составе Se-НЧ компонентов с поверхности бактериальных клеток было проведено иммунохимическое исследование в двух вариантах. Были проанализированы Se-НЧ и содержащие белки фракции, выделенные с поверхности Se-НЧ, полученных с использованием штаммов *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S (см. раздел 2.3.7).

Дот-блот-анализ. На нитроцеллюлозную мембрану наносили по 1 мкл растворов Se-НЧ (концентрация не определялась) и биополимеров (концентрация по белку 43 мкг/мл, определялась по Бредфорду), экстрагированных с их поверхности. Далее для обоих растворов была выполнена серия десятикратных разведений (4–6), которые также были нанесены по 1 мкл на мембрану. После фиксации образцов (высыхание при комнатной температуре в течение 15 мин) был проведен дот-анализ по стандартной методике с использованием 0,05% полиэтиленгликоля (М 20000) для блокирования сайтов связывания нитроцеллюлозы. В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела к нативным клеткам *A. brasilense* штаммов Sp7 (Шелудько с соавт., 2010) и Sp245 (Guliy *et al.*, 2007), а также антитела к липополисахариду (Konnova *et al.*, 2008) и флагеллину штамма *A. brasilense* Sp7 (Бурыгин с соавт., 2007). Вторичными антителами служили конъюгаты анти-кроличьих антител с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch). Ферментативную реакцию проводили в 0,05% растворе 3,3'-диаминобензидина в ФСБ (рН 7,3) с добавлением 0,02% перекиси водорода.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Анализировали раствор биополимеров (концентрация по белку 43 мкг/мл, определялась по Бредфорду), экстрагированных с поверхности Se-НЧ; в качестве контроля был использован соответствующий экстрагирующий буфер. Растворы были

разведены двукратно в ФСБ в лунках первого ряда планшета, после чего было сделано десять двукратных разведений в ФСБ. Сорбцию препаратов осуществляли в течение ночи при +4°C. Анализ был проведен по стандартной методике. Были использованы те же растворы и антители, что и при дот-анализе. Для проведения ферментативной реакции в лунки вносили по 50 мкл 0,03% раствора *o*-фенилендиамина в 0,1 М цитратном буфере (pH 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) при 492 нм. Из полученных значений были вычтены величины, соответствующие пустым лункам (references), и построен график зависимости ОП раствора при 492 нм от номера лунки с двукратным разведением.

2.3.10 Определение концентрации селенит-ионов

Остаточная концентрация селенит-ионов в культуральной жидкости после инкубации бактерий с Na_2SeO_3 была определена следующим образом: клетки были осаждены центрифугированием при 12000g в течение 5 мин, полученный надосадок помещен в лунки 96-луночного полистиролового планшета и смешан в соотношении 1:1 с 1 М раствором аскорбиновой кислоты. Селенит в надосадке восстанавливался до элементарного селена, окрашивая суспензию в красный цвет. После инкубации в течение 10 мин интенсивность окраски определяли по ОП при 600 нм (Li *et al.*, 2014).

2.3.11 Динамическое рассеяние света и измерение дзета-потенциала

Исследование методом динамического рассеяния света (ДРС) и измерение дзета-потенциала суспензий Se-НЧ происходило с использованием двухуглового анализатора размеров частиц и молекул Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Великобритания).

2.3.12 ИК-фурье-спектроскопия

Подготовка бактериальных образцов. Суспензии осаждались центрифугированием 7000g, 10 мин. Клетки трижды отмывались стерильным ФР при 7000g 10 мин, затем осадок был высушен в сушильном шкафу при 45°C до постоянной массы. Высушенная биомасса была измельчена в агатовой ступке до порошкообразного состояния и ресуспендирована в минимальном объеме деионизированной воды.

Для ИК-фурье-спектроскопического исследования полученные суспензии бактериальных клеток и суспензии Se-НЧ были нанесены на диски ZnSe (CVD-ZnSe, R'AIN Optics, Дзержинск, Россия; диаметр 2,5 см, толщина 0,2 см) и высушены при 45°C.

ИК-фурье-спектроскопическое исследование проводилось на спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation, США; детектор – DTGS detector; светоделитель – KBr). Спектры были усреднены из 64 сканирований в режиме пропускания (разрешение 4 cm^{-1}) относительно ZnSe.

Спектры были обработаны с помощью программы OMNIC (версия 8.2.0.387). Стандартная обработка включала автоматическую коррекцию базовой линии, автоматическое сглаживание с использованием алгоритма Савицкого-Голея (построение скользящей средней с помощью полинома второго порядка, сглаживание из 95 точек) и определение положения максимумов полос поглощения. Все спектроскопические измерения повторялись дважды или трижды для каждого образца и хорошо воспроизводились.

2.3.13 Спектроскопия комбинационного рассеяния

Для СКР бактериальные клетки были осажжены центрифугированием при 7000g в течение 10 мин и трижды отмыты стерильным ФР. После отмывки клетки были ресуспендированы в минимальном количестве (около 50 мкл) деионизированной воды. Бактериальные клетки и водные суспензии Se-НЧ были нанесены на алюминиевую фольгу или стекло и высушены при комнатной температуре.

Исследование методом СКР проводилось на спектрометре комбинационного рассеяния Peak Seeker Pro 785 (Ocean Optics, Великобритания; $\lambda = 785$ нм, мощность излучения 30 мВт; спектральный диапазон 150–2100 см^{-1}). Время ожидания составляло 10 с, все спектры были усреднены из более 10 независимых сканирований. Экспериментальные данные были обработаны с использованием программы Microsoft Excel 2010.

2.3.14 Атомно-абсорбционная спектрометрия

Определение содержания селена в образцах проводили на атомно-абсорбционном спектрометре Thermo Scientific iCE 3500 (Thermo Scientific, США) с электротермическим атомизатором на длине волны 196,0 нм. В качестве источника света использовали лампы полого катода (Thermo Scientific, США). Для устранения влияния неселективного поглощения на результаты анализа применяли корректор Зеемана. Измерения проводили с использованием в качестве модификатора 20 мкг никеля в виде нитрата никеля. Для градуировки спектрометра использовались государственный стандартный образец состава растворов ионов селена(IV) ГСО 7779-2000. Все использованные реактивы имели квалификацию “осч”. Измерения проводили в трехкратной повторности.

2.3.15 Просвечивающая электронная микроскопия

Для ПЭМ образцы были нанесены на сеточки с формваровой подложкой следующим способом: на Parafilm наносили одну каплю (20 мкл) образца и две капли воды Milli-Q. Сверху на каплю наносили сеточку с формваровой подложкой, подложкой вниз. После инкубации в течение 9 мин сеточку в том же положении (подложкой вниз) переносили на водную каплю и держали 1 мин для отмывки несвязавшегося материала. Затем отмывку повторяли еще один раз. Далее сеточки выкладывали на фильтровальную бумагу в чашку Петри для сушки подложкой вверх.

Микрофотографии ПЭМ были получены на электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, ФРГ) при 120 кВ.

2.3.16 Определение цитотоксичности суспензий наночастиц селена по дыхательной активности на клетках HeLa

Дыхательную активность определяли по способности клеток восстанавливать краситель нитротетразолевый синий до формазана по стандартной методике (Bernas & Dobrucki, 2000). В работе использованы клетки карциномы шейки матки человека (HeLa). Клетки культивировали в питательной среде ДМЕМ (БиолоТ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (БиолоТ) в ячейках 96-луночного планшета. По достижении культурой клеточного монослоя в 70–90% (клетки образуют монослой, но при этом между ними остается незаполненное клетками пространство, лунка заполнена на 70–90 %), старую питательную среду удаляли и вносили свежую, содержащую исследуемую суспензию Se-НЧ. Далее клетки культивировали в течение 1 сут. После инкубации питательную среду удаляли, в лунку вносили 100 мкл 0,5% раствора нитротетразолевого синего бромида и инкубировали 1 ч при 37°C. После инкубации раствор удаляли, к осадку добавляли 100 мкл диметилсульфоксида и измеряли ОП клеточных суспензий при 540 нм.

2.3.17 Статистическая обработка полученных результатов

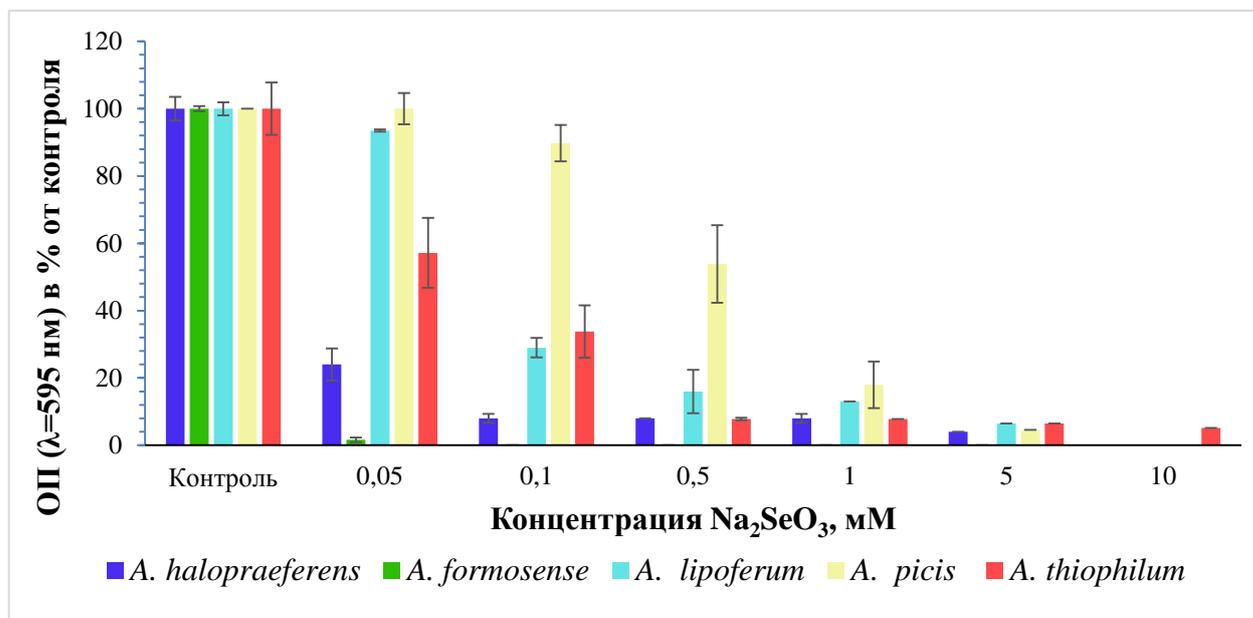
Все эксперименты были проведены по крайней мере в 3-х повторностях. Математическую обработку данных проводили с использованием статистического пакета анализа данных программы Microsoft Excel 2003.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние селенит-ионов на рост бактерий рода *Azospirillum* и определение их способности к образованию наночастиц селена

При выращивании бактерий в присутствии оксоанионов селена часто наблюдается изменение цвета среды культивирования или бактериальных колоний до различных оттенков красного цвета, являющееся первым признаком восстановления соединений селена до элементарного Se^0 (Hunter & Manter, 2009, Roux *et al.*, 2001). Кроме этого, восстановление селенитов и селенатов может происходить не на логарифмической стадии роста, а на стационарной (Sarret *et al.*, 2005). Для штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 восстановление ионов SeO_3^{2-} начинается после значительного замедления роста культуры (удлинения лаг-фазы) на 4 сут культивирования (Tugarova *et al.*, 2014, Vogel *et al.*, 2018). В настоящем исследовании эти данные для *A. brasilense* Sp7 и Sp245 использовались для сравнения влияния селенит-ионов на другие виды азоспирилл: *A. formosense*, *A. picis*, *A. halopraeferense*, *A. palatum*, *A. zeaе*, *A. thiophilum* и *A. lipoferum*. На способность к восстановлению ионов SeO_3^{2-} тестировались типовые штаммы указанных видов. Был использован диапазон концентраций селенита от 0,05 до 15 мМ.

После 18 ч роста в присутствии селенита рост тестируемых культур ингибировался следующим образом (в порядке уменьшения ингибирования, определяемого снижением ОП культуры по сравнению с контролем без селенита): *A. formosense* CC-Nfb-7 > *A. halopraeferense* Au4 > *A. thiophilum* BV-S > *A. lipoferum* Sp59b > *A. picis* IMMIB TAR-3 (рис. 5). *A. zeaе* N7 проявлял схожую с *A. picis* IMMIB TAR-3 устойчивость; однако из-за сильной флокуляции культуры было затруднительно измерять ОП. Точно определить токсическую концентрацию для *A. palatum* ww 10 после 18 ч не удалось. Культура показывала разные показатели роста, а также сильно флокулировалась. При 0,5 мМ селенита после 18 ч культура значительно ингибировалась: от 24 до 39% от контроля в различных экспериментах.



Данные представлены в процентах от ОП контроля (за 100% принята ОП культур без добавления Na₂SeO₃) ± стандартная ошибка.

Рисунок 5 – Ингибирование роста различных видов азоспирилл в присутствии Na₂SeO₃ после 18 ч роста

Наиболее чувствительным к действию селенита оказался *A. formosense* CC-Nfb-7, рост которого полностью ингибировался уже при 0,05 мМ Na₂SeO₃. Следующим был *A. halopraeferense* Au4, для которого наблюдалось снижение роста на 76% уже при 0,05 мМ Na₂SeO₃. Для *A. thiophilum* BV-S снижение ОП на 43% наблюдалось при 0,1 мМ, рост фактически отсутствовал при концентрациях Na₂SeO₃ 0,5 мМ и выше (рис. 5). Для *A. lipoferum* Sp59b при 0,05 мМ наблюдалось незначительное ингибирование (на 6,5 %). Для данного штамма в среде наблюдаются флоккулы, при концентрациях 1–5 мМ рост полностью отсутствует. Рост данной культуры значительно снижался при 0,1 мМ селенита, составляя ~30% от контроля, совпадая с таковым при этой концентрации для *A. thiophilum* BV-S (рис. 5). Снижение роста *A. picis* IMMIB TAR-3 (на 10%) начиналось при 0,1 мМ Na₂SeO₃ (рис. 5). При 0,5 мМ рост составил всего 54% от контроля, при этом бактериальная культура имела легкий розоватый оттенок. При 1–5 мМ рост сильно подавлялся.

При культивировании в течение 7 сут картина изменялась. Наиболее чувствительным к токсическому действию Na_2SeO_3 оказался *A. halopraeferens* Au4. При концентрациях Na_2SeO_3 0,5 мМ и выше рост данного штамма не восстанавливался в течение 7 сут. При концентрациях 0,05 и 0,1 мМ уже на 2 сут наблюдалось светло-розовое окрашивание, интенсивность которого увеличивается по мере увеличения концентрации селенита в среде (рис. 6). Интенсивность окрашивания при этих концентрациях Na_2SeO_3 усиливалась к 7 сут. Рост при 0,05 мМ Na_2SeO_3 восстанавливался после 3 сут. Для этого штамма наблюдался значительно сниженный рост по сравнению с другими видами азоспирилл даже в оптимальных условиях.



1 2 3 4 5 6

1 – контроль, культура без Na_2SeO_3 ; 2 – 0,05 мМ Na_2SeO_3 ; 3 – 0,1 мМ, 4 – 0,5 мМ; 5 – 1 мМ; 6 – 5 мМ.

Рисунок 6 – *A. halopraeferens* Au4, выращенный в течение 2 сут в присутствии различных концентраций селенита

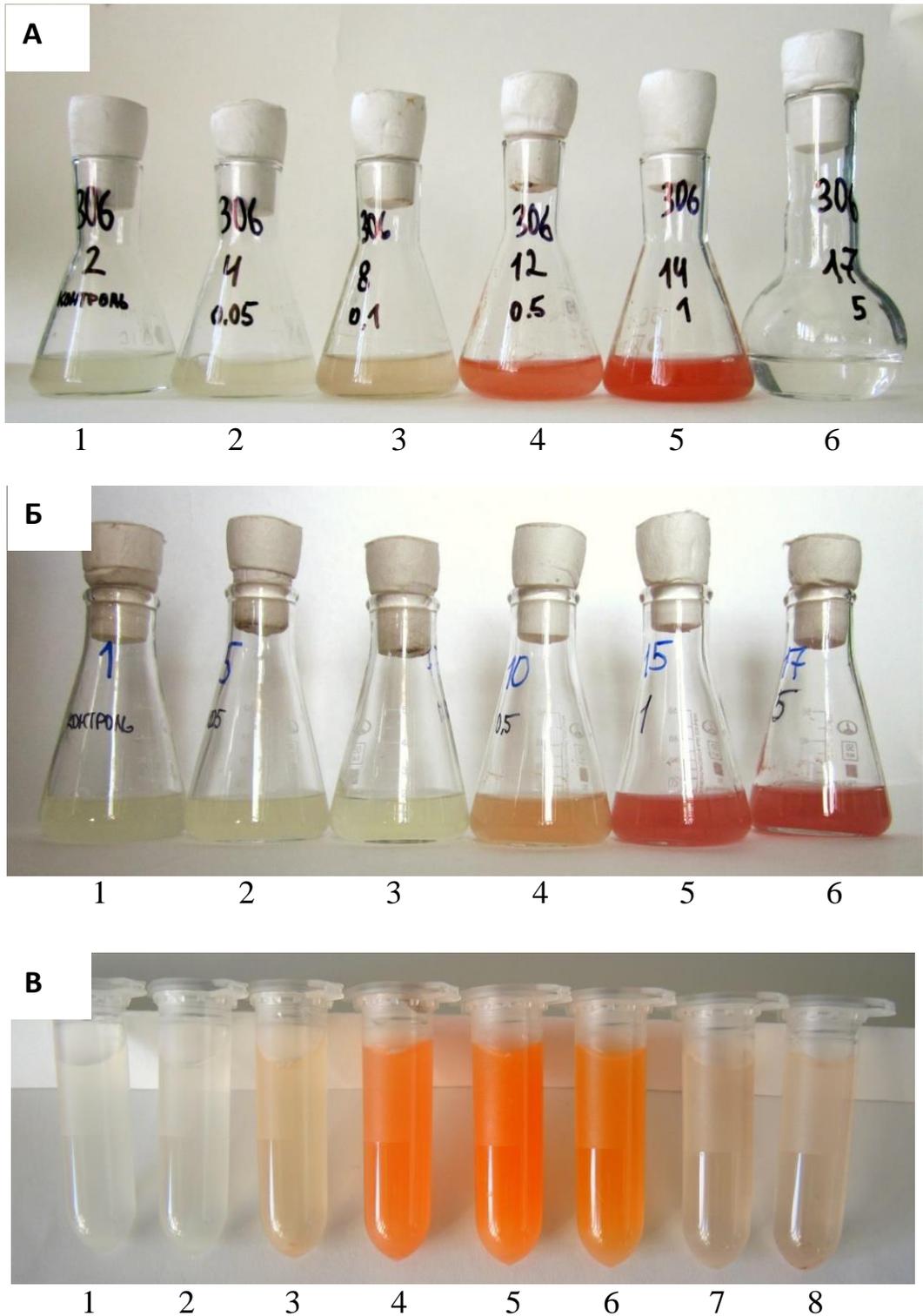
Рост *A. formosense* CC-Nfb-7 восстанавливался до 1 мМ Na_2SeO_3 на 2 сут, на 7 сут при концентрациях 0,1–1 мМ наблюдалось окрашивание от розоватого до красного, его интенсивность увеличивалась с увеличением концентрации селенита в среде. В присутствии 5 мМ Na_2SeO_3 рост не восстанавливался (рис. 7А).

Для *A. lipoferum* Sp59b на 7 сут роста при 0,5–5 мМ селенита наблюдается окрашивание, увеличивающееся с ростом концентрации селенита от оранжеватого до розовато-оранжево-красного при 5 мМ (рис. 7Б).

A. palatum ww 10 на 7 сут роста при 0,5 и 1 мМ селенита имел розовато-бежевый цвет, фактически неотличимый от контроля. При концентрации 5 мМ наблюдалось интенсивное ярко-розовое окрашивание. Рост и картина восстановления у бактерий видов *A. picis* IMMIB TAR-3 и *A. palatum* ww 10 на 7 сут были аналогичными представленным на рис. 7Б для *A. lipoferum* Sp59b.

Для *A. thiophilum* BV-S рост культуры восстанавливался на 2 сут. После 3 сут наблюдалось восстановление селенита до элементарного селена, проявляющееся в окрашивании бактериальной суспензии. Цвет изменялся с течением времени от слегка до интенсивно оранжево-красного на 7 сут (рис. 7В). Концентрацию, полностью ингибирующую рост бактерии, в исследуемом диапазоне выявить не удалось. Слабый бактериальный рост наблюдался даже при 15 мМ Na_2SeO_3 .

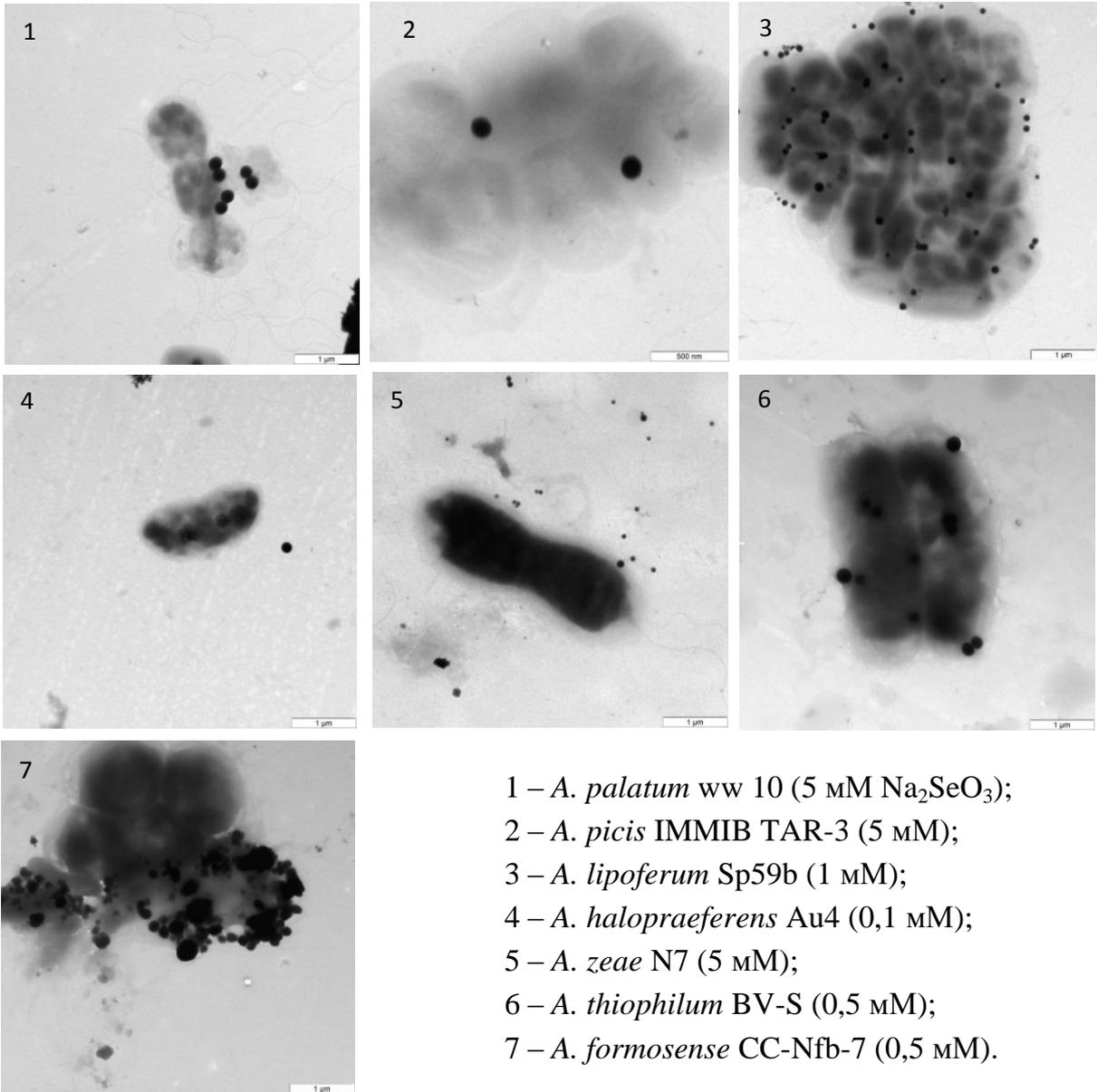
Для *A. zeae* N7 не удалось определить ингибирующую рост концентрацию, так как культура заметно флокулировала, что затрудняло исследование. Рост бактерии наблюдался до 5 мМ селенита, таким образом, этот вид азоспирилл, наряду с *A. thiophilum*, является одним из самых устойчивых к действию Na_2SeO_3 среди азоспирилл. На 7 сут светло-персиковое окрашивание наблюдалось в присутствии 0,5 мМ Na_2SeO_3 , интенсивность окрашивания возрастала с концентрацией селенита в среде, при 5 мМ наблюдалось оранжевато-розовое окрашивание флокул бактериальной культуры.



A – *A. formosense* CC-Nfb-7; Б – *A. lipoferum* Sp59b; В – *A. thiophilum* BV-S;
 1 – контроль, культура без Na_2SeO_3 ; 2 – 0,05 мМ Na_2SeO_3 ; 3 – 0,1 мМ, 4 – 0,5 мМ; 5 – 1 мМ; 6 – 5 мМ; 7 – 10 мМ; 8 – 15 мМ Na_2SeO_3

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

Результаты ПЭМ показали, что все исследованные виды азоспирилл оказались способны к синтезу Se-НЧ в процессе роста на среде, содержащей селенит (рис. 8). При этом, как можно наблюдать, Se-НЧ были локализованы как внутри клеток, так и экстраклеточно.



- 1 – *A. palatum* ww 10 (5 mM Na₂SeO₃);
 2 – *A. picis* IMMIB TAR-3 (5 mM);
 3 – *A. lipoferum* Sp59b (1 mM);
 4 – *A. halopraeferens* Au4 (0,1 mM);
 5 – *A. zeaе* N7 (5 mM);
 6 – *A. thiophilum* BV-S (0,5 mM);
 7 – *A. formosense* CC-Nfb-7 (0,5 mM).

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 8 – Способность бактерий рода *Azospirillum* к образованию Se-НЧ в процессе роста на жидкой среде, содержащей селенит

Бактерии различаются по чувствительности к токсическому действию оксоанионов селена. Эндофитные микробные сообщества, выделенные из

растений-гипераккумуляторов селена, содержат виды, выдерживающие до 200 мМ Na_2SeO_3 и Na_2SeO_4 (Sura-de Jong *et al.*, 2015). Анализ биотипов с помощью масс-спектрометрии (MALDI-ToF) и секвенирование 16S рРНК показали, что такие сообщества содержат бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Advenella*, *Arthrobacter* и *Variovorax* (Sura-de Jong *et al.*, 2015). Изучение восстановления селенита для почвенных бактерий актуально, так как такие бактерии можно использовать для биоремедиации загрязненных земель и водоемов. Принципиальная возможность использования бактерий рода *Azospirillum* для биоремедиации была показана для штамма *A. brasilense* Cd на примере вод реки Шпрее (Германия) и шахтных вод Кенигштайна (Vogel *et al.*, 2018).

Таким образом, исследуемые виды азоспирилл по-разному реагировали на присутствие селенит-ионов в среде, для всех наблюдалось удлинение лаг-фазы. Сходные с результатами для вида *A. brasilense* данные по восстановлению селенита и его токсичности были получены для вида *A. formosense* CC-Nfb-7. *A. halopraeferense* Au4 оказался самым чувствительным к селениту, его рост полностью ингибировался уже при 0,5 мМ Na_2SeO_3 . Есть публикации, в которых для других бактерий показана схожие, ингибирующие рост концентрации селенита: *Bacillus subtilis* (>1мМ) и *Wolinella succinogenes* DSM 1740 (1 мМ) (Hunter & Manter, 2009). Виды *A. picis* IMMIB TAR-3, *A. palatum* ww 10, *A. lipoferum* Sp59b проявляли бóльшую устойчивость по сравнению с *A. brasilense* Sp7 и Sp245, выдерживая до 5 мМ селенита. Примерно такая же устойчивость показана для штаммов *Pseudomonas fluorescens* FK-121 и *Pseudomonas stutzeri* FK-2 и FR-1 (≥ 5 мМ), *E. coli* W1485 (5,8 мМ), *Ralstonia metallidurans*, *Rhizobium fredii* USDA 201 и *Rhizobium etli* TAL 182 (6 мМ) (Hunter & Manter, 2009). Наиболее устойчивыми к токсическому действию оказались *A. thiophilum* BV-S и *A. zeae* N7 – до 10 мМ Na_2SeO_3 (и даже выше, до 15 мМ для *A. thiophilum* BV-S), по сравнению с *A. brasilense* Sp7 и Sp245, для которых рост при 10 мМ Na_2SeO_3 полностью ингибировался (Тугарова с соавт., 2013; Tugarova *et al.*,

2014). Однако при выращивании культура *A. zeae* N7 сильно флокулировала, что затрудняло оценку ее роста. Сходная с показанной нами для *A. thiophilum* BV-S и *A. zeae* N7 устойчивость к селениту сообщается для *Bradyrhizobium japonicum* (6–12 мМ) *Aeromonas salmonicida* C278 (>16 мМ), *Rhizobium selenitireducens* B1 (8–16 мМ), *T. selenatis* (>10 мМ) (Hunter & Manter, 2009). Была показана возможность использования микроорганизмов со схожей устойчивостью к селениту для биоремедиации (Масу *et al.*, 1993). Также следует отметить, что исследуемые нами микроорганизмы оказывают стимулирующее действие на рост растений; следовательно, при использовании азоспирилл возможно получать бóльшую совокупную пользу, чем при использовании других бактерий с аналогичной толерантностью к селениту.

У всех тестируемых видов азоспирилл в присутствии селенита наблюдалось окрашивание бактериальных суспензий в разные оттенки красного и розового цвета, причем цвет суспензий различался в зависимости от вида бактерий и концентрации селенита в среде, а также от времени роста. Все исследованные виды азоспирилл оказались способны к синтезу Se-НЧ, при этом бактерии, при росте которых наблюдалось розовое окрашивание, имели затемнение в клетках, наряду с наносферами.

На основании проведенных экспериментов для дальнейшей работы отобран штамм *A. thiophilum* BV-S (как наиболее устойчивый к селениту). Также решено продолжить работы с *A. brasilense* Sp7 и Sp245 как с наиболее изученными штаммами. Эти штаммы различаются по способности к колонизации корней пшеницы: *A. brasilense* Sp245 способен проникать внутрь растительного корня – штамм-эндофит, в отличие от *A. brasilense* Sp7, который колонизирует только поверхность корня: штамм-эпифит (Schloter & Hartmann, 1998). Данное различие определяет и другие свойства данных штаммов, в частности, различную реакцию на стрессовые факторы (Kamnev *et al.*, 2012).

3.2 Получение наночастиц селена с использованием азоспирилл

Бактериальный синтез наночастиц имеет ряд недостатков. Предложенные до настоящего момента методы бактериального синтеза Se-НЧ в большинстве работ предполагают выращивание бактерий в присутствии селенита в течение от 48 ч (Srivastava & Mukhopadhyay, 2015; Zhang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010) до 3 сут (Oremland *et al.*, 2004). Во многих случаях бактерии синтезируют наночастицы внутри клеток (Kessi *et al.*; 1999, Narasingarao & Häggblom, 2007), что требует дополнительной процедуры разрушения бактериальных клеток для очистки Se-НЧ. Помимо этого, биологически синтезированные Se-НЧ часто гетерогенны по размеру. Таким образом, основными недостатками современных методов биологического синтеза являются: затратность по времени, внутриклеточная локализация Se-НЧ и их гетерогенность по размерам. В связи с этим, задачей нашего исследования являлся подбор условий для бактериального синтеза Se-НЧ, а именно: определение оптимальной концентрации селенита, времени инкубации и других условий восстановления оксоанионов селена бактериями, что может минимизировать вышеуказанные недостатки.

При выращивании бактерий параллельно с восстановлением селенита происходят процессы роста и деления бактериальных клеток. Также, наряду с клетками и Na_2SeO_3 , в среде находятся другие компоненты, возможно, оказывающие влияние на восстановление селенит-ионов бактериями. В биотехнологии часто применяется подход с использованием биомассы микроорганизмов, отмытой от компонентов среды, для получения различных соединений: аминокислот, антибиотиков и др. Такой подход для получения Se-НЧ с использованием бактерий ранее не использовался.

Исходя из всего вышеперечисленного, нами было предложено выращивать бактерии без добавления Na_2SeO_3 до поздней логарифмической фазы роста (~18 ч у данных штаммов азоспирилл), с последующей инкубацией отмытых от компонентов среды клеток в присутствии Na_2SeO_3 . При этом клетки лишаются питательных веществ для роста, но остаются

метаболически активными. Проведенные эксперименты показали, что в таких условиях уже через 24 ч развивалось интенсивное красное окрашивание, а на микрофотографиях ПЭМ наблюдалось образование Se-НЧ. Важной особенностью синтеза Se-НЧ в такой системе являлась их внеклеточная локализация, в отличие от выращивания азоспирилл в присутствии селенита (Тугарова с соавт., 2013; Tugarova *et al.*, 2014). Последнее позволило существенно упростить процесс выделения Se-НЧ.

Для оптимизации условий синтеза Se-НЧ проведено изучение влияния следующих параметров: (1) концентрации селенита, (2) времени инкубации, (3) pH буферного раствора и (4) плотности культуры бактериальных клеток.

3.2.1 Определение оптимальных концентраций селенита

Для подбора условий синтеза Se-НЧ нами были использованы штаммы *A. brasilense* Sp245 и Sp7, различающиеся по занимаемой экологической нише. Ранее было показано, что концентрации 0,08–1 мМ Na₂SeO₃ в среде для этих штаммов являются токсическими и замедляют бактериальный рост (Тугарова с соавт., 2013; Tugarova *et al.*, 2014).

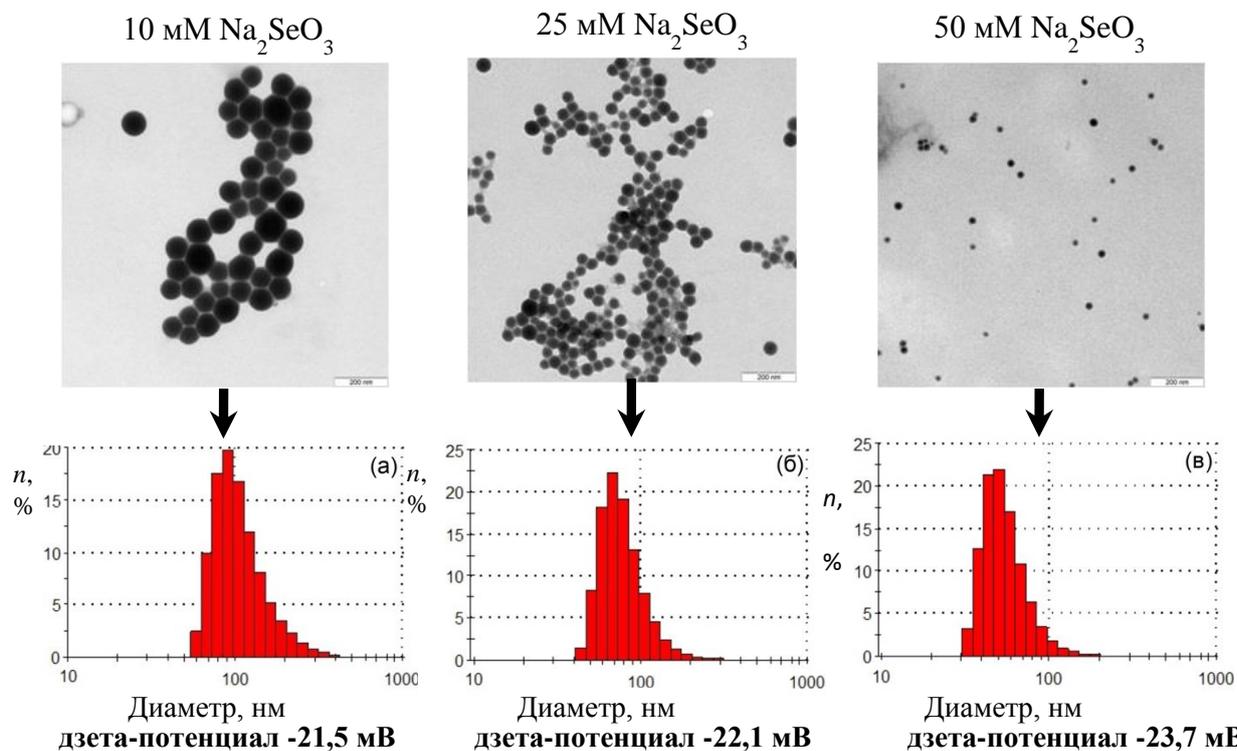
В наших экспериментах было показано, что с повышением концентрации селенита интенсивность окрашивания бактериальных культур при выращивании усиливается от фактически неокрашенных до интенсивных красно-оранжевых оттенков. Такой эффект наблюдался до определенной концентрации селенита, в зависимости от используемого штамма. При превышении этих концентраций интенсивность красного окрашивания значительно снижалась и бактериальные культуры приобретали сероватый оттенок. Отсутствие окрашивания при малых концентрациях, вероятно, связано с тем, что селен ассимилируется/используется как микроэлемент клетками, при высоких же концентрациях селенит токсичен и приводит к гибели бактериальных клеток, и восстановление Na₂SeO₃ становится невозможным.

Для подбора оптимальных концентраций Na₂SeO₃ для получения Se-НЧ проводилась инкубация в ФР отмытых от среды культивирования

бактериальных клеток *A. brasilense* Sp245 с 10, 25 и 50 мМ Na_2SeO_3 в течение 24 ч в термостате при 32°C. Надо отметить, что при таких условиях возможно использование бóльших концентраций Na_2SeO_3 , чем при выращивании, так как количество клеток в суспензии значительно увеличивается.

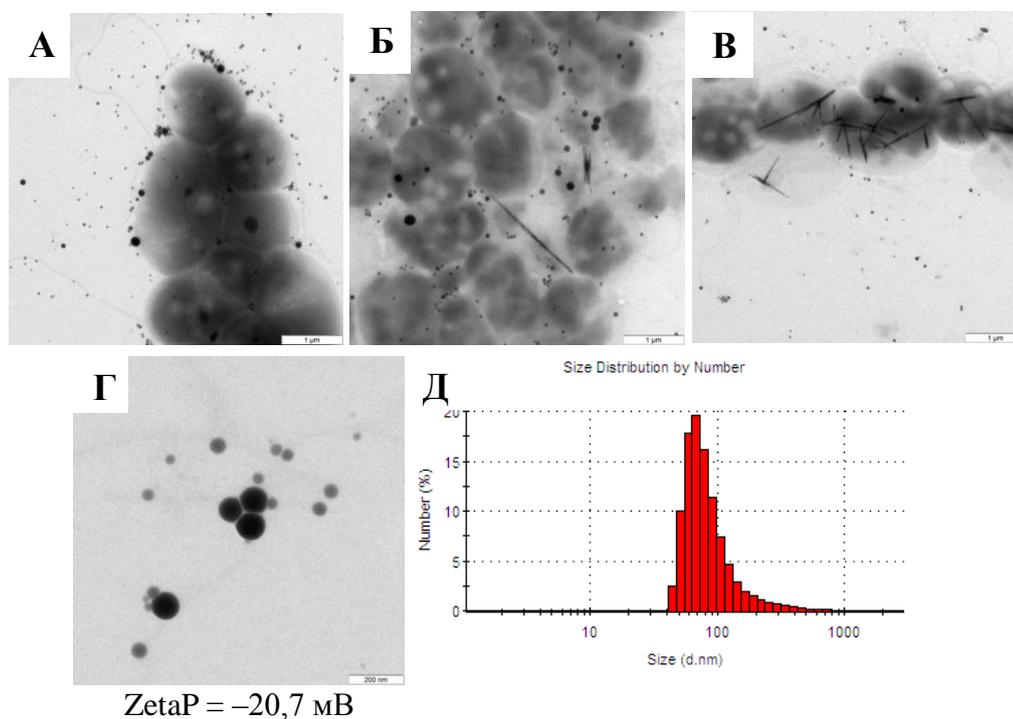
Наночастицы, полученные с помощью *A. brasilense* Sp245, различались по размеру и количеству в зависимости от концентрации селенита в среде (рис. 9). По данным ПЭМ, Se-НЧ, полученные с использованием 10 мМ SeO_3^{2-} , имели диаметр ~80 нм и характеризовались бóльшими размерами по сравнению с Se-НЧ, полученными при 25 и 50 мМ Na_2SeO_3 , а также большей гомогенностью по размеру. Se-НЧ, полученные при инкубации с 25 мМ селенита, были более гетерогенными по размеру, со средним диаметром ~47–50 нм; при 50 мМ – ~30 нм. Следует отметить, что размеры, определенные методом ДРС, были схожими, но бóльшими, чем определенные с помощью ПЭМ. Это объясняется тем, что методом ДРС измеряется не истинный, а гидродинамический диаметр Se-НЧ. Также с помощью ДРС определялся дзета-потенциал Se-НЧ – параметр, характеризующий устойчивость коллоидных растворов к агрегации: для устойчивых коллоидов его величина имеет абсолютное значение ≥ 30 мВ. Дзета-потенциал Se-НЧ был примерно одинаковым для всех используемых концентраций селенита и составлял: минус 23,7 мВ для Se-НЧ, полученных при инкубации с 50 мМ; –22,1 мВ – для 25 мМ и –21,5 мВ – для 10 мМ. Результаты говорят об относительной устойчивости данных коллоидных растворов полученных Se-НЧ к агрегации.

Для получения Se-НЧ с помощью *A. brasilense* Sp7 использовались 5, 10 и 25 мМ Na_2SeO_3 (рис. 10). Данный штамм в используемой системе выдерживает меньшие концентрации по сравнению с *A. brasilense* Sp245. При концентрации 25 мМ наблюдалось изменение окрашивания бактериальных суспензий на серо-розовое; при этом с помощью ПЭМ зафиксировано появление кристаллов внутри бактериальных клеток (рис. 10В). Оптимальными для получения Se-НЧ для этого штамма были концентрации Na_2SeO_3 5 мМ и 10 мМ.



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

Рисунок 9 – Наночастицы селена, полученные при инкубации *A. brasilense* Sp245 (24 ч) в присутствии различных концентраций Na_2SeO_3



А–В – ПЭМ биомассы бактерий, бар – 1 мкм;
Г – Se-НЧ, бар – 200 нм; Д – распределение Se-НЧ по размерам. Концентрация Na_2SeO_3 (мМ): А, Г, Д – 5; Б – 10; В – 25.

Рисунок 10 – Наночастицы селена, полученные при инкубации *A. brasilense* Sp7 (24 ч) в присутствии различных концентраций Na_2SeO_3

Средний диаметр Se-НЧ, полученных при инкубации *A. brasilense* Sp7 с 5 mM Na_2SeO_3 в течение 24 ч, измеренный с помощью ПЭМ, составлял ~ 90 нм. Это хорошо согласуется с данными, полученными с помощью ДРС (рис. 10Д). Зета-потенциал таких наночастиц составлял $-20,7$ мВ.

3.2.2 Динамика образования наночастиц селена

Для определения оптимального времени инкубации был проведен мониторинг синтеза Se-НЧ с использованием штамма *A. brasilense* Sp245 при 3-х концентрациях Na_2SeO_3 : 10, 25 и 50 mM. Для этого каждый час в течение первых 8 ч и с 18 по 24 ч клеточные суспензии, инкубируемые в присутствии Na_2SeO_3 , были исследованы с помощью ПЭМ.

Динамика образования Se-НЧ у данного штамма была следующей: после 4 ч инкубации в клеточных суспензиях образуется множество мелких наночастиц, гетерогенных по размеру. Далее мелкие частицы начинают увеличиваться в размерах с увеличением времени инкубации, однако сохраняется их гетерогенность по размерам. Наблюдались единичные крупные наночастицы конечного (максимального для каждой концентрации селенита) размера уже после 4 ч инкубации. Также после 4 ч наблюдалось небольшое окрашивание, интенсивность которого возрастала к 24 ч. По истечении 24 ч количество Se-НЧ конечного размера было максимальным по сравнению с более ранними микрофотографиями. Увеличение интенсивности окрашивания клеточных суспензий, инкубируемых с селенитом, таким образом, связано с увеличением количества Se-НЧ.

Аналогичный мониторинг синтеза Se-НЧ был проведен для штамма *A. brasilense* Sp7 в присутствии 5 mM Na_2SeO_3 . Появление мелких Se-НЧ фиксировалось уже на 1 ч инкубации. Окрашивание суспензий происходило быстрее, после 1 ч инкубации. Количество Se-НЧ, достигших максимального диаметра, после 4 ч инкубации было больше, чем для штамма *A. brasilense* Sp245. Скорость восстановления селенит-ионов у данного штамма, таким

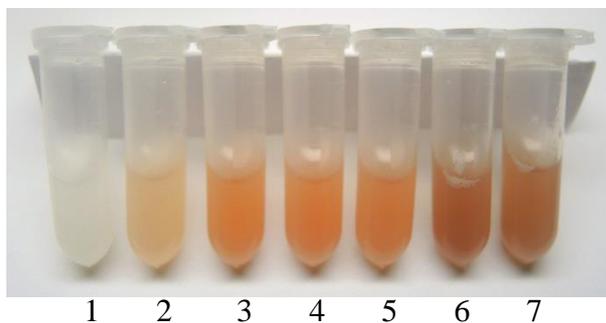
образом, выше, чем у *A. brasilense* Sp245. Время инкубации было продлено до 24 ч для получения большего количества Se-НЧ.

Мы считаем, что размер Se-НЧ регулируют белки, стабилизирующие их и не позволяющие им агрегировать в более крупные конгломераты (такие белки часто входят в состав Se-НЧ, синтезированных бактериями). Наше предположение согласуется с данными, полученными для других бактерий (Debieux *et al.*, 2011). Разница в размерах, наблюдаемая для Se-НЧ при различных концентрациях, может быть объяснена тем, что на размер Se-НЧ при их сборке может влиять молярное соотношение Na_2SeO_3 /белок, молекулы которого выступают в роли матрицы (Kaur *et al.*, 2009).

Таким образом, для синтеза Se-НЧ было выбрано время 24 ч при оптимальной концентрации селенит-ионов для *A. brasilense* Sp245 – 10 мМ, для *A. brasilense* Sp7 – 5 и 10 мМ.

3.2.3 Влияние pH на образование наночастиц селена

Были протестированы следующие растворы: буферы по Макилвейну с pH 3–7, ФСБ с pH 7,3 и ФР. В экспериментах был использован штамм *A. brasilense* Sp7, время инкубации – 24 ч, концентрация Na_2SeO_3 – 10 мМ. Начальная концентрация бактериальных клеток составляла $\sim 16 \times 10^9$ кл./мл. Было зафиксировано изменение окраски клеточных суспензий, инкубируемых в буферах с pH 4,0 до 7,3 (рис. 11).

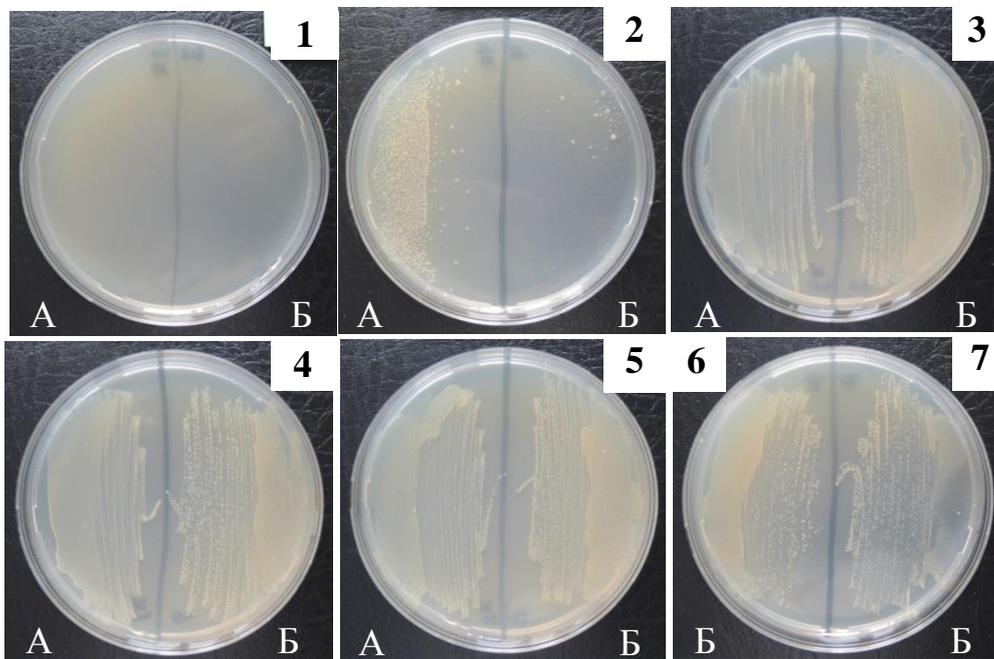


1– 5 буферные растворы по Макилвейну с различным pH:
1 – 3; 2 – 4; 3 – 5; 4 – 6; 5 – 7; 6 – ФСБ (pH 7,3); 7 – ФР.

Рисунок 11 – *A. brasilense* Sp7, инкубируемый 24 ч в присутствии 10 мМ Na_2SeO_3 в растворах с различным pH

Как видно из рис. 11, наиболее интенсивное окрашивание происходило при инкубации в буфере по Макилвейну с рН 5–7. При инкубации в буфере по Макилвейну с рН 3 клетки остались неокрашенными, что свидетельствует об отсутствии восстановленного Se^0 в суспензии.

Для проверки жизнеспособности клеток после инкубации с селенитом был произведен высев на чашки Петри. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в соответствующем буфере без селенита. На рис. 12 видно, что клетки, инкубированные в буфере по Макилвейну с рН 3, не жизнеспособны даже в контроле (рост на чашке отсутствует полностью). ПЭМ не показала наличия Se-НЧ в данном варианте. Это подтверждает, что к восстановлению SeO_3^{2-} способны только живые клетки. Инкубированные в буфере с рН 4 клетки показывали гораздо менее интенсивный рост, чем в вариантах с использованием буферов с рН 5, 6 и 7, а также с использованием ФСБ с рН 7,3 и ФР. Культуры с 10 мМ Na_2SeO_3 в вариантах с рН 5, 6 и 7, а также в ФСБ и ФР показывали фактически такой же рост, как и в контролях.



А – клетки в буфере без селенита (контроль для данной среды); Б – клетки, инкубируемые в присутствии 10 мМ Na_2SeO_3 ; 1 – буфер по Макилвейну с рН 3; 2 – рН 4; 3 – рН 5; 4 – рН 6; 5 – рН 7; 6 – ФСБ; 7 – ФР (для 6 и 7 контроль не показан).

Рисунок 12 – Рост *A. brasilense* Sp7 после инкубации в течение 24 ч в присутствии 10 мМ Na_2SeO_3 в растворах с различными рН

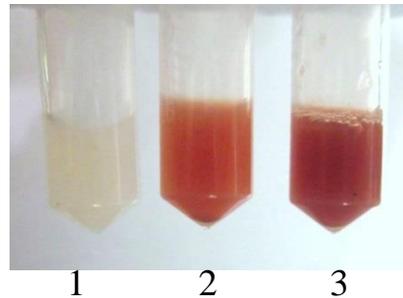
Из бактериальных суспензий, инкубированных в присутствии селенита, в буферах по Макилвейну с рН 4, 5, 6, 7, а также в ФСБ и ФР, были выделены Se-НЧ. ПЭМ не показала различий в размерах и однородности по размерам полученных Se-НЧ, поэтому оптимальной средой для синтеза Se-НЧ был выбран ФР, так как он содержит меньшее количество компонентов.

3.2.4 Плотность бактериальной культуры

Так как восстановление Na_2SeO_3 происходит с помощью ферментативных процессов бактериальных клеток, нами было увеличено количество клеток в суспензии для более полного восстановления селенита и увеличения количества образуемых Se-НЧ. Концентрацию бактериальных клеток *A. brasilense* Sp245 увеличивали в 2 и 4 раза, что составляло $\sim 8 \times 10^9$ и $\sim 16 \times 10^9$ кл./мл соответственно: отмытые клетки были ресуспендированы в $\frac{1}{2}$ и $\frac{1}{4}$ от начального объема в ФР. Интенсивность окрашивания бактериальных суспензий, свидетельствующая о восстановлении Na_2SeO_3 до элементарного селена, увеличивалась с увеличением числа бактериальных клеток. В дальнейших экспериментах бактериальные суспензии *A. brasilense* Sp245 концентрировали в 4 раза. Аналогичное исследование было проведено для *A. brasilense* Sp7, клетки ресуспендировали в $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ и $\frac{1}{8}$ от начального объема. При использовании одинаковой концентрации Na_2SeO_3 наиболее интенсивная красная окраска суспензий, свидетельствующая о восстановлении селенит-ионов до элементарного селена, наблюдалась у клеточных суспензий, сконцентрированных в 4 раза. При 8-кратном увеличении ($\sim 32 \times 10^9$ кл./мл) восстановление проявлялось сильнее, однако цвет суспензий менялся на серовато-бордовый (рис. 13). Для данного штамма оптимальным также было определено концентрирование бактериальных клеток в 4 раза.

Таким образом, оптимальной плотностью бактериальной суспензии для синтеза Se-НЧ во всех экспериментах была выбрана концентрация клеток

$\sim 16 \times 10^9$ кл./мл, что требует концентрирования в 4 раза суспензии клеток с величиной ОП = 1.

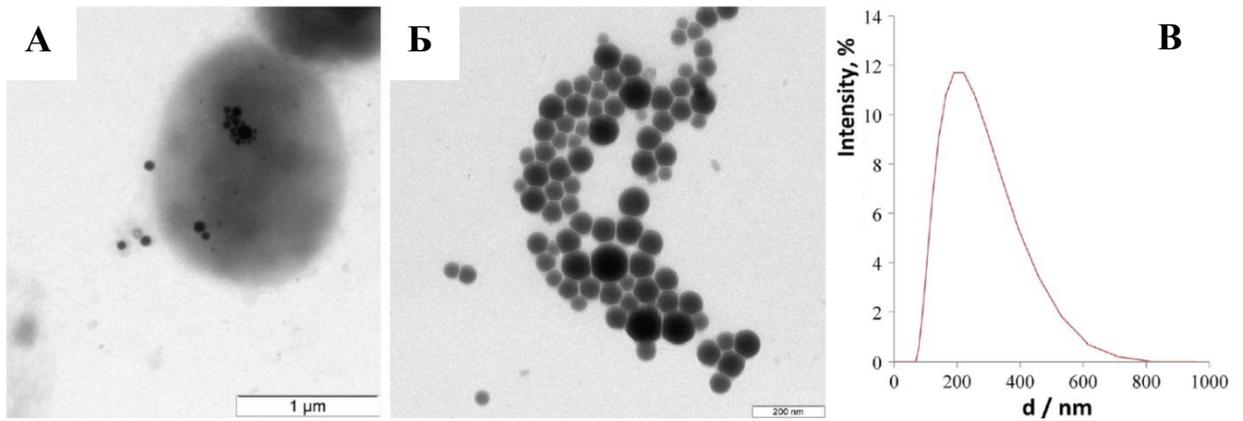


1 – контроль, клетки без Na_2SeO_3 , клетки сконцентрированы: 2 – в 4 раза; 3 – в 8 раз
 Рисунок 13 – *A. brasilense* Sp7, инкубированный в течение 24 ч стерильном ФР в присутствии 10 мМ Na_2SeO_3

3.2.5 Получение наночастиц селена с использованием других бактерий

Выявленные закономерности были использованы для получения Se-НЧ с помощью другого вида азоспирилл – *A. thiophilum*, а также *E. coli* К-12, с некоторыми модификациями. Интерес к использованию штамма *A. thiophilum* BV-S для синтеза Se-НЧ был обусловлен наибольшей устойчивостью этого штамма азоспирилл к действию Na_2SeO_3 из всех исследованных в данной работе штаммов. Для определения наиболее оптимальной концентрации для получения Se-НЧ с помощью *A. thiophilum* BV-S был протестирован диапазон концентраций 1–100 мМ. Оптимальная концентрация Na_2SeO_3 составляла 5 мМ.

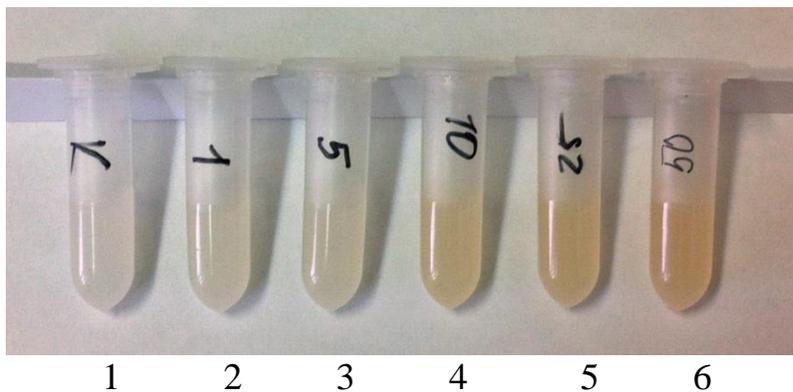
Размер Se-НЧ, полученных с помощью *A. thiophilum* BV-S, составлял около 50–200 нм, с наибольшим содержанием частиц диаметром 200 нм, что подтверждается данными, полученными с помощью ДРС (рис. 14). Дзета-потенциал наночастиц, полученных с помощью *A. thiophilum* BV-S при инкубации в присутствии 5 мМ селенита, составлял –18,5 мВ, что говорит о сравнительной устойчивости данного коллоидного раствора к агрегации. Дзета-потенциалы Se-НЧ, полученных с помощью штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245, находятся в диапазоне от –20,7 до –23,7 мВ.



А – Микрофотографии ПЭМ клеток, инкубированных в течение 24 в присутствии 5 мМ Na_2SeO_3 (бар – 1 мкм); Б – очищенных Se-НЧ (бар – 200 нм); В – распределение по размерам (d – диаметр) полученных Se-НЧ (согласно ДРС)

Рисунок 14 – Se-НЧ, синтезированные с помощью *A. thiophilum* BV-S

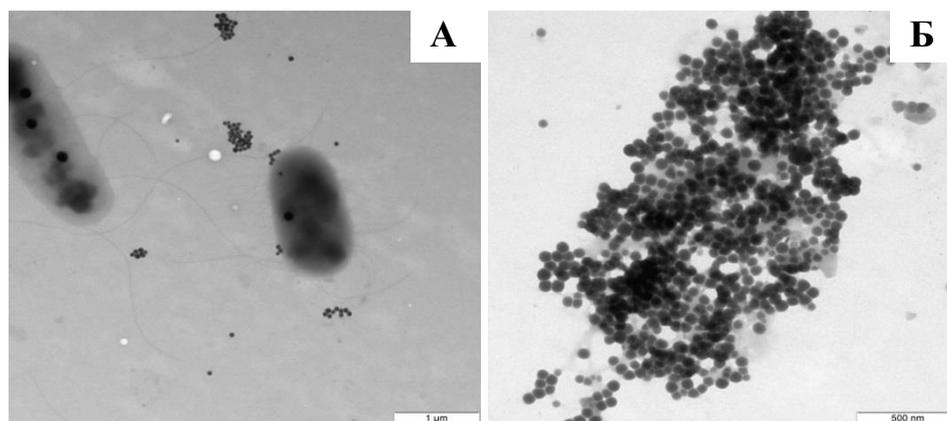
Похожие дзета-потенциалы были найдены для Se-НЧ, синтезированных другими микроорганизмами (Lampis *et al.*, 2017; Jain *et al.*, 2015; Estevam *et al.*, 2017). Мониторинг синтеза Se-НЧ штаммом *A. thiophilum* BV-S показал наличие слабого окрашивания бактериальной суспензии, инкубируемой в присутствии 10 мМ Na_2SeO_3 , уже на 1 ч (рис. 15), что говорит, вероятно, о более высокой скорости синтеза Se-НЧ при этой концентрации селенита у *A. thiophilum* BV-S по сравнению с *A. brasilense* Sp245 и о схожей – по сравнению с *A. brasilense* Sp7.



1 – контроль, культура без Na_2SeO_3 ; 2 – 1 мМ Na_2SeO_3 ; 3 – 5 мМ, 4 – 10 мМ; 5 – 25 мМ; 6 – 50 мМ

Рисунок 15 – *A. thiophilum* BV-S, инкубированный в течение 1 ч в присутствии различных концентраций Na_2SeO_3

Разработанная нами методика была использована для получения Se-НЧ с помощью *E. coli* K-12. Клетки инкубировались в присутствии 1 мМ Na₂SeO₃ при 37°C (рис. 16), время инкубации – 24 ч. Следует отметить, что Se-НЧ при использовании *E. coli* K-12 образуются также и внутри бактериальных клеток, однако количество внеклеточных Se-НЧ сильно превышает количество внутриклеточных. В других публикациях для очистки Se-НЧ с использованием *E. coli* предлагаются сложные способы (Xia *et al.*, 2018; Medina Cruz *et al.*, 2018). В работе Kora & Rastogi (2016) Se-НЧ получали, выращивая штамм *E. coli* ATCC 35218 в статических условиях. Метод очистки включал центрифугирование, однако, полной методики синтеза и очистки Se-НЧ в данной работе не представлено (Kora & Rastogi, 2016).



А – Микрофотографии ПЭМ клеток *E. coli* K-12, инкубированных в течение 24 ч в присутствии 1 мМ Na₂SeO₃ (бар – 1 мкм); Б – очищенных Se-НЧ (бар – 500 нм)

Рисунок 16 –Se-НЧ, синтезированные с использованием *E. coli* K-12

Полученные результаты показывают, что методика для бактериального синтеза экстраклеточных Se-НЧ, разработанная на штаммах *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* Sp7, может быть использована также и для других видов азоспирилл, а также, при некоторых модификациях (включающих подбор концентраций селенита), и для других микроорганизмов. Дальнейшей задачей было отделение Se-НЧ от бактериальных клеток.

3.2.6 Выделение наночастиц селена

Экстраклеточная локализация Se-НЧ при использовании разработанной нами методики значительно облегчила их выделение. Было предложено осаждать бактерии центрифугированием с последующим концентрированием надосадка, содержащего Se-НЧ. В рамках работы были протестированы режимы центрифугирования 150g – 12000g с изменением времени центрифугирования от 5 до 30 мин. Оптимальным режимом, позволяющим получить наибольшее разделение Se-НЧ и бактериальных клеток, был 1400g в течение 5 мин. При осаждении клеток с бóльшим ускорением (1500g – 12000g) наночастицы осаждались вместе с клетками, супернатант оставался прозрачным, с меньшим (150g – 1000g) – практически все клетки штамма *A. brasilense* Sp245 оставались в суспензии. Для осаждения клеток *A. brasilense* Sp7 наиболее оптимальным был режим центрифугирования при 150g в течение часа.

Для удаления остатков клеток надосадок пропускали через микронный фильтр. Для этого мы протестировали фильтры из различных материалов с размером пор 0,22 или 0,44 мкм. Фильтры с мембраной из АЦ не использовались в дальнейшей работе, так как Se-НЧ сорбировались на поверхности мембраны, что было связано, как было показано впоследствии, с наличием в составе Se-НЧ биологических макромолекул, прочно ассоциированных с поверхностью Se-НЧ. Данные, полученные другими исследователями, также подтверждают большую агрегацию белков на фильтрах из ацетата целлюлозы по сравнению с фильтрами из ПЭС и ПВДФ (Mahler *et al.*, 2010). При этом авторы указывают, что фильтры из ПЭС и ПВДФ, выпущенные разными производителями, также различаются по способности к адсорбции белков. Для всех последующих экспериментов были использованы фильтры из ПЭС или ПВДФ, характеризующиеся низким связыванием белков.

После фильтрации полученные Se-НЧ концентрировали центрифугированием и ресуспендировали в деионизированной воде.

Для дополнительной очистки Se-НЧ отмывали от 1 до 3 раз в деионизированной воде. При этом следует отметить, что, как было показано с

использованием ИКФС для Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7, количество отмывок, следующих после первой, фактически не влияет на количество биологических макромолекул, ассоциированных с наночастицами.

Таким образом, нами разработана методика синтеза Se-НЧ, схематично представленная на рис. 17. Она включает несколько основных этапов: (1) выращивание культуры; (2) сбор и отмывка выросшей культуры; (3) инкубация с Na_2SeO_3 ; (4) очистка и концентрирование Se-НЧ.

Мы подобрали условия для получения Se-НЧ с помощью бактериальной биомассы трех штаммов азоспирилл: *A. brasilense* Sp 245, *A. brasilense* Sp7, *A. thiophilum* BV-S. Впервые для получения гомогенных по размеру Se-НЧ была использована живая бактериальная биомасса, рост которой был ограничен в связи с отсутствием питательных веществ. Полученные Se-НЧ находились вне бактериальных клеток (данные ПЭМ), что позволяло облегчить процесс очистки наночастиц.

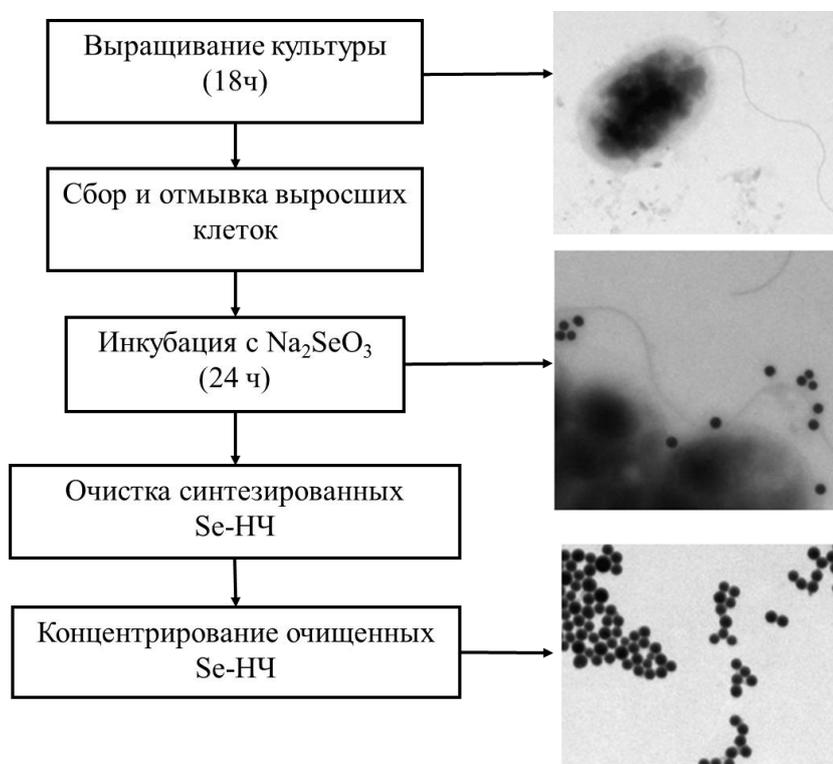


Рисунок 17 – Общая схема получения Se-НЧ с использованием бактерий

Описанный в данной работе метод позволяет сократить время синтеза Se-НЧ до 24 ч или менее (при использовании штамма *A. thiophilum* BV-S), 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 вида. Как было показано выше с помощью высева на питательную среду бактерий после инкубации с селенитом в течение 24 ч, бактериальные клетки остаются жизнеспособными; следовательно, полученную биомассу можно использовать повторно. Также следует отметить, что бактериальный синтез Se-НЧ, в отличие от химического, не требует особенной чистоты Na_2SeO_3 .

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

3.3.1 ИК-спектроскопическая характеристика наночастиц селена

Биологически синтезированные наночастицы, согласно литературным данным, могут содержать ассоциированные с их поверхностью биологические макромолекулы (Debieux *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2015; Lampis *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). При изучении их состава часто используют ИКФС, которая позволяет выявлять наличие различных биологических макромолекул, таких как белки и полисахариды, в составе Se-НЧ (Tugarova & Kamnev, 2017). Методом ИКФС были изучены Se-НЧ, синтезированные с помощью штаммов *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S (культуры бактериальных клеток *A. brasilense* Sp7, инкубированные в присутствии селенита, использовались для сравнения).

На рис. 18 представлены ИК-спектры (измеренные в режиме пропускания) образцов биомассы *A. brasilense* Sp7, инкубированной в присутствии 10 мМ Na_2SeO_3 (18А), и выделенных Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7 (18Б) и *A. thiophilum* BV-S (18В). Соотнесение

основных полос на ИК-спектрах с функциональными группами представлено в табл. 5.

ПЭМ бактериальных клеток *A. brasilense* Sp7, инкубированных в присутствии 10 мМ селенита, показала наличие электроплотных сферических частиц; практически все они были локализованы экстраклеточно (рис. 18А, вставка). На ПЭМ-фотографиях изолированных Se-НЧ, полученных с использованием *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S, отсутствуют какие-либо клетки или их фрагменты и наблюдается менее электроплотный матрикс, который предположительно является слоем биополимеров (рис. 18Б, 18В, вставки).

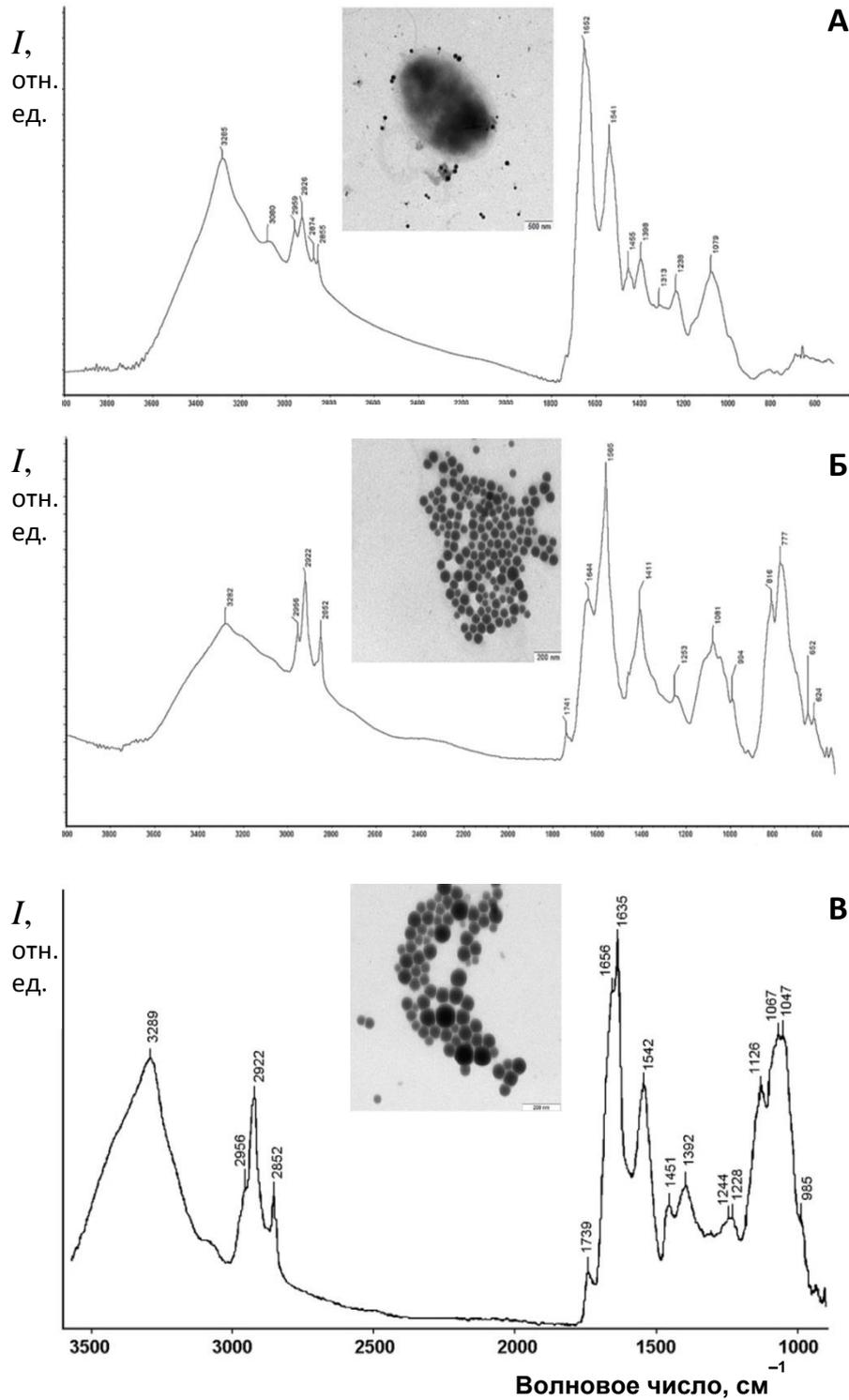
Выделенные Se-НЧ дают специфические ИК-спектры, показанные на рис. 18Б, 18В, отличные от спектра бактериальной культуры. Можно четко идентифицировать типичные полосы, соответствующие белковым связям:

1. Амид-I: для образца (2) при 1644 см^{-1} , что соответствует неупорядоченной вторичной структуре белка, и для образца (3) – 1656 см^{-1} и 1635 см^{-1} , соответствующие α - и β -структурам, соответственно;

2. Амид-II (при 1540 см^{-1} , полностью перекрытая для образца (2) и частично – для (3));

3. Амид-III (при 1253 см^{-1}).

Типичная полоса белковой связи амид-II (при 1540 см^{-1}) присутствует в спектре образца (3), но для образца (2) перекрывается очень интенсивной полосой валентных антисимметричных колебаний карбоксильной связи (COO^-) в области 1565 см^{-1} . Данная полоса может появляться и в других, более высоко- или низкочастотной областях (Barth *et al.*, 2007). Присутствие карбоксильных групп (помимо отрицательных зарядов на Se-НЧ) также подтверждается для обоих образцов наличием валентных симметричных колебаний $\nu_s(\text{COO}^-)$ при 1411 и 1392 см^{-1} , а также деформационных (при $816\text{--}777\text{ см}^{-1}$) колебаний карбоксильной связи для образца (2).



На вставках представлены микрофотографии ПЭМ. Бар: А – 500 нм; Б, В – 200 нм.

Рисунок 18 – ИК-фурье-спектры (режим пропускания, ZnSe-диски) биомассы бактерий *A. brasilense* Sp7, инкубированных при 32°C в течение 24 ч с 10 мМ Na₂SeO₃ (А), и Se-НЧ, полученных с использованием *A. brasilense* Sp7 (Б) и *A. thiophilum* BV-S (В). (I – интенсивность поглощения; отн. ед.)

Таблица 5 – Соотнесение основных полос с функциональными группами в исследуемых образцах (волновые числа, λ , см^{-1})

Функциональная группа \ Образец	Биомасса <i>A. brasilense</i> Sp7 +10 мМ Na_2SeO_3 (1)	Se-НЧ <i>A. brasilense</i> Sp7 (2)	Se-НЧ <i>A. thiophilum</i> BV-S (3)
О–Н; N–Н (Амид А в белках), ν	3285 3080	3282 ~3080 (п.)	3282 ~3080 (п.)
С–Н в $-\text{CH}_3$, ν_{as}	2959	2956	2956 (сл., п.)
С–Н в $>\text{CH}_2$, ν_{as}	2926	2922	2922
С–Н в $-\text{CH}_3$, ν_{s}	2874	пер. ^б	пер. ^б
С–Н в $>\text{CH}_2$, ν_{s}	2855	2852	2852
С=О (эфирная связь), ν	~1740 (п.) ^с	1741	1739 (сл.)
Амид I (в белках) ^а	1652	1644	1656, 1635
Карбоксил COO^- , ν_{as}	пер.	1565	пер.
Амид II (в белках)	1541	пер.	1542
$-\text{CH}_3/-\text{CH}_3$, δ (в белках, липидах, полиэфирах и др.)	1455	п.	1451
COO^- , ν_{s}	1398	1411	1392
Амид III / О–P=O ν_{as}	1238	1253	1244, 1228 (сл.)
С–О, С–С ν , С–О–Н, С–О–С, δ (в полисахаридах и полиэфирах)	1079	1081	1126, 1067, 1047
COO^- , δ ; «область отпечатков пальцев»	о.сл.	816 777	сл.

Обозначения: ν – валентные колебания; ν_{s} – симметричные валентные колебания; ν_{as} – антисимметричные валентные колебания; δ – деформационные колебания; п. – плечо; сл. – слабое; о.сл. – очень слабое; – отсутствие полосы; пер. – связь возможно перекрыта более сильной соседней.

^а регистрируемые полосы амид I соответствуют преобладающей: α -спирали для образца (1); неупорядоченной – (2); α - (1656 см^{-1}) и β -структурам (1635 см^{-1}).

^б менее интенсивные симметричные колебания ν_{s} (С–Н) метильных групп (которые при разрешении появляются примерно при 2874 см^{-1}) могут маскироваться более сильными колебаниями ν_{as} (CH_2) при 2922 см^{-1} и ν_{s} (CH_2) при 2852 см^{-1} в алифатических цепях в липидах.

Следует отметить, что все колебания карбоксильных связей на спектре клеток, которые могут соответствовать колебаниям боковых цепей аминокислот клеточных белков и/или карбоксилированных полисахаридов, также перекрыты более сильными соседними колебаниями или значительно ниже их по интенсивности (таблица 5).

Смещение полосы амид I (1644 см^{-1}) в составе белков, покрывающих поверхность Se-НЧ, в область более низких частот по сравнению с таковым для клеточных белков (1652 см^{-1} , таблица 5) предположительно свидетельствует о том, что вторичная структура белков бактериальных клеток, представленная преимущественно α -спиральными участками (Naumann, 2000; Beekes *et al.*, 2007; Kamnev, 2008; Kamnev *et al.*, 2008; Naumann, 2001; Barth *et al.*, 2007), отличается от очевидно неупорядоченной структуры белков, связанных с поверхностью Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7. Для Se-НЧ, полученных с помощью *A. thiophilum* BV-S, также наблюдалось изменение в данной области: появление полос, соответствующих белковым β -структурам.

Типичная область колебаний полисахаридов ($1200\text{--}950 \text{ см}^{-1}$) также характеризуется заметным поглощением, соответствующим колебаниям связей C–O/C–C и C–OH или C–O–C (рис. 18Б, 18В). Всё это свидетельствует о присутствии белков и полисахаридов в биомакромолекулярном слое, адсорбированном на поверхности Se-НЧ, который также можно видеть на ПЭМ (вставка на рис. 18Б и 18В). По литературе, в составе других биологически синтезированных наночастиц также присутствуют биомакромолекулы (Shirsat *et al.*, 2015, Wadhvani *et al.*, 2016, Jain *et al.*, 2015, Lampis *et al.*, 2016, Dobias *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016; Gonzalez-Gil *et al.*, 2016; Mollania *et al.*, 2016).

Содержание карбоксильных остатков в биомакромолекулярной оболочке Se-НЧ, синтезированных с помощью *A. thiophilum* BV-S, значительно более низкое по сравнению с данными для Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7, что также подтверждено более низким дзета-

потенциалом для этих наночастиц. Это, вероятно, связано с небольшими изменениями в процедуре очистки этих образцов: частичным удалением карбоксилат-содержащих соединений в ходе отмывки наночастиц, полученных с помощью *A. thiophilum* BV-S. Количество карбоксильных остатков снижается с увеличением количества отмывок. Таким образом, карбоксилат-содержащие компоненты, скорее всего, не слишком прочно связаны с поверхностью Se-НЧ, в отличие от биомакромолекулярной оболочки, которая остается стабильной. Причины такой частичной вариабельности связанного с поверхностью слоя биологически синтезированных Se-НЧ требует дальнейшего исследования.

Наличие карбоксильных групп обеспечивает стабильность суспензий 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 азоспириллами, составлял минус (18–24) мВ.

В области валентных колебаний связи $\nu(\text{C-H})$ ($3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$) биополимеры, ассоциированные с Se-НЧ, показывают значительно более высокие интенсивности колебаний $\nu(\text{CH}_2)$ при 2922 и 2852 см^{-1} , чем таковые для $\nu(\text{CH}_3)$, по сравнению с аналогичной областью в бактериальных клетках. Такое повышение относительной интенсивности колебаний групп $-\text{CH}_2-$ (по сравнению с $-\text{CH}_3$) может быть связано с присутствием липидов (включая алифатические цепи остатков жирных кислот) в слое, связанном с Se-НЧ. Это также подтверждается появлением полос, соответствующих $\nu(\text{C=O})$ сложноэфирных карбонильных групп, характерных для липидов, при 1741 см^{-1} и 1739 см^{-1} в спектрах образцов Se-НЧ (рис. 18Б, 18В). Также было показано, что липиды могут присутствовать в биополимерном слое, связанном с бактериально синтезированными Se-НЧ (Gonzalez-Gil *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2018).

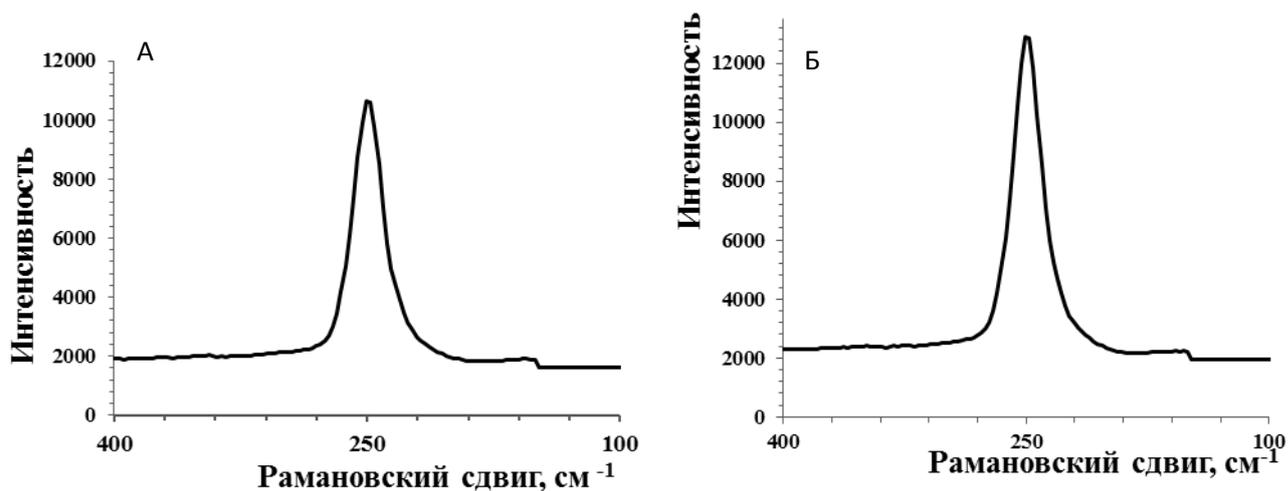
В то время как отмеченные спектроскопические особенности могут логически вытекать из различий в молекулярной структуре клеточных макромолекул и макромолекул, ассоциированных с Se-НЧ, также нельзя исключать вероятность, что перераспределение интенсивностей в ИК-спектрах может быть связано с эффектами, обусловленными наноразмерностью (аналогичными плазмонному резонансу на золотых наночастицах), для Se-НЧ. Для подтверждения такой возможности необходимо провести дополнительные исследования, так как, в отличие от благородных металлов, Se-НЧ как полупроводники не могут иметь достаточного количества проводящих электронов (плазмонов).

Проведенное исследование биоорганического слоя поверхности Se-НЧ с помощью ИКФС позволяет заключить, что в его состав входят белки, полисахариды и липиды. Отрицательный дзета-потенциал Se-НЧ обусловлен наличием на поверхности Se-НЧ карбоксильных групп; однако определить, к каким макромолекулам они относятся, не представляется возможным.

3.3.2 Характеристика наночастиц селена с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния

СКР чувствительна к различным аллотропным модификациям селена (Lucovsky *et al.*, 1967; Van Overschelde & Guisbiers, 2015), что используется для исследования наноматериалов, состоящих из селена.

В низкочастотной области спектра КР Se-НЧ, синтезированных с использованием *A. brasilense* Sp7 и *A. thiophilum* BV-S, наблюдается один пик с максимумом при 250 см^{-1} , соответствующий A1-колебаниям связи Se-Se (рис. 19). Положение пика, а также его уширение (примерно 30 см^{-1} на половине интенсивности) соответствует аморфной модификации Se (Lucovsky *et al.* 1967; Van Overschelde & Guisbiers, 2015; Kora & Rastogi, 2016).



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

Рисунок 19 – спектры КР Se-НЧ, полученных при инкубации бактерий рода *Azospirillum* в присутствии 5 мМ Na_2SeO_3 в течение 24 ч

Дополнительным доказательством содержания в исследуемых Se-НЧ селена в аморфной модификации является отсутствие любых других заметных пиков низкой интенсивности, близких к области 250 см^{-1} (рис. 19). Также следует отметить, что согласно (Eysel & Sunder, 1979), спектры КР чистого поликристаллического селена, помимо узкого интенсивного пика колебаний связи Se–Se при 251 см^{-1} , имеют четко идентифицируемое плечо при $\sim 240 \text{ см}^{-1}$, а также пик аналогичной ширины при 111 см^{-1} , характеризующий деформационные колебания скелета молекул Se_8 . Последняя область находится вне спектрального диапазона, исследуемого в данной работе. Похожие частоты колебаний были описаны для α -моноклинной кристаллической формы селена (Lucovsky *et al.*, 1967). Для аморфной формы селена ими же описано поглощение в области 250 см^{-1} , связанное с колебаниями связей Se–Se, также имеющее плечо при 235 см^{-1} (связанное с валентными колебательными модами E и A_1 цепи полимерной структуры). В нашем случае не наблюдается видимого плеча в этой области (что, в случае выбранного разрешения, также не наблюдалось и во второй производной спектра; данные не показаны). Это может указывать на некоторые структурные различия между биологически синтезированными

Se-НЧ, содержащими аморфный селен (аналогичным исследуемым в этой работе), и объемным аморфным селеном, исследованным в работе (Lucovsky *et al.*, 1967), что требует дальнейшего изучения.

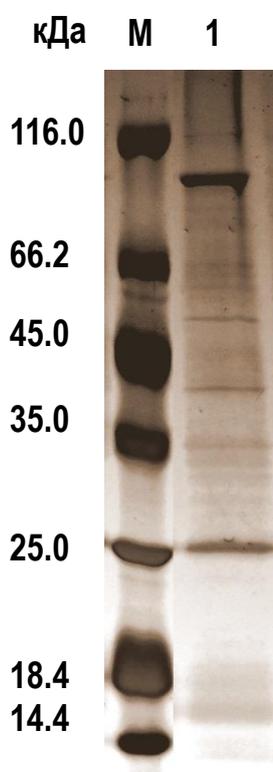
3.4 Электрофоретическое исследование белковой составляющей наночастиц селена, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7

Элементарный селен, образующийся в результате бактериального восстановления, чаще всего находится в среде или внутри бактериальных клеток не в виде кристаллов, а в виде сферических наночастиц. Предположительно это связано с тем, что бактериальные белки, ассоциированные с поверхностью Se-НЧ, стабилизируют их структуру, предотвращая кристаллизацию (Kessi *et al.*, 1999). Были выделены и охарактеризованы отдельные белки, входящие в состав Se-НЧ, синтезированных бактериями. Впервые такой белок был показан для Se-НЧ, полученных с помощью бактерии *T. selenatis*. Se-НЧ содержали в своем составе белок с молекулярной массой 95 кДа. Он был назван SefA (Se factor A). Предполагается, что этот белок участвует в процессе стабилизации селеновых наночастиц и препятствует их агрегации (Debieux *et al.*, 2011). Также, как описано выше, исследования Se-НЧ, полученных с помощью бактерий рода *Azospirillum*, с применением ИКФС и ПЭМ показали наличие на их поверхности биологических макромолекул, в том числе и белков.

Для изучения белков, ассоциированных с Se-НЧ, эти белки были отделены от Se-НЧ. Выделение белков происходило с использованием двух вариантов растворов на основе буферной системы Трис/HCl с pH 8,0. Инкубирование Se-НЧ с буфером, имеющим в составе 3 мМ ЭДТА и сахарозу, не приводило к выделению достаточного количества белка. Для оптимизации процесса выделения была добавлена обработка ультразвуком в течение 20 мин. Другими авторами было показано, что для более полного отделения ассоциированных с поверхностью Se-НЧ белков возможно использование до 10% SDS в качестве денатурирующего агента (Dobias *et al.*,

2011). Исходя из этого, второй буфер, использованный нами, содержал 10% SDS; он оказался оптимальным для выделения белков, ассоциированных с поверхностью Se-НЧ. Для более полного отделения белков также была использована двукратная обработка ультразвуком в течение 20 мин.

Денатурирующий электрофорез белковой составляющей, ассоциированной с Se-НЧ, показал наличие доминирующей полосы белка массой 96 кДа и менее интенсивной – 25 кДа (рис. 20). Мы предполагаем, что эти белки принимают участие в сборке Se-НЧ у бактерий рода *Azospirillum* и обеспечивают стабильность суспензий таких Se-НЧ.



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

Рисунок 20 – Электрофоретический профиль белковой составляющей, выделенной с поверхности Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7

В 2011 г. был опубликован обширный обзор, посвященный идентификации белков, высокоаффинных к бактериально и химически синтезированным Se-НЧ (Lenz *et al.*, 2011). Мы провели поиск в базе данных PubMed последовательностей белков, которые, по данным этих авторов,

связаны с селеновыми наночастицами, синтезированными бактериями. С помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) были найдены гомологичные последовательности в протеоме *A. brasilense* (taxid 192, включающий в том числе и Sp7). Поиск проводился по избыточной белковой базе данных – Non-redundant protein sequence database. Всего для анализа было использовано 86 аминокислотных последовательностей, из которых для 82 были найдены гомологи в геноме азоспирилл. Наибольшие совпадения были показаны для белков: фактора элонгации Tu (elongation factor Tu); 30S-рибосомального белка S4 и инозин-5-монофосфат-дегидрогеназы (IMP dehydrogenase) различных бактерий.

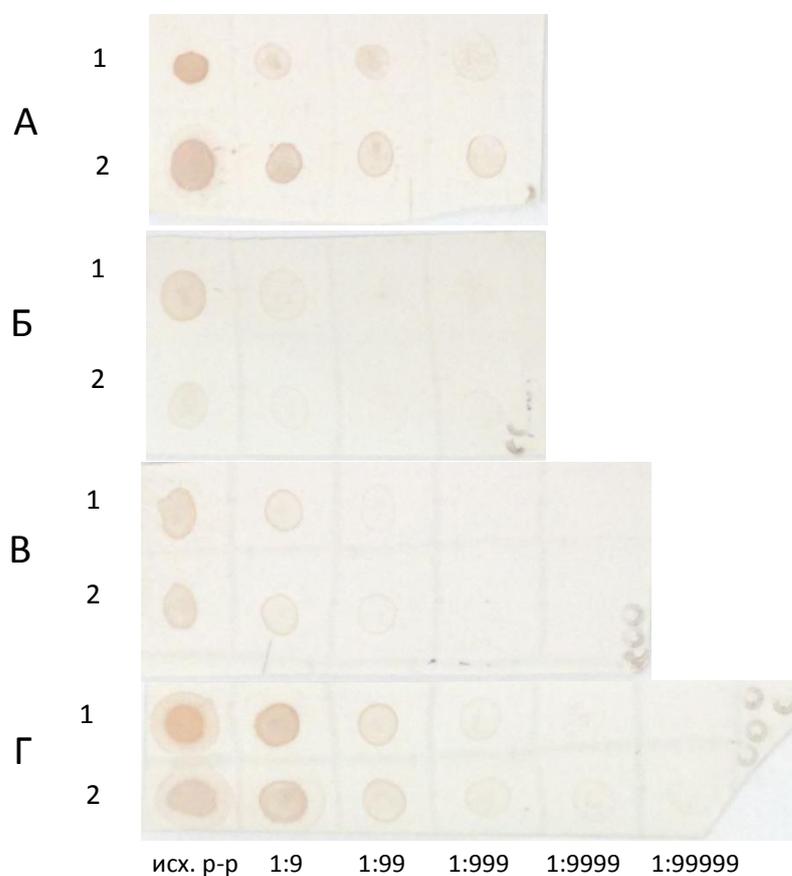
В указанном выше обзоре (Lenz *et al.*, 2011) авторы предполагают наличие белков, высокоаффинных к бактериально и химически синтезированным Se-НЧ. Они указывают, что наибольшей аффинностью к Se-НЧ среди исследованных ими белков обладала редуктаза металлоидов RarA из *S. barnesii*. Было предположено, что этот фермент содержит мотивы, которые обуславливают высокое сродство этого белка к селену. Проведенный поиск гомологичных указанной редуктазе белков с помощью программы BLAST показал, что данный белок не имеет гомологов в протеоме *A. brasilense*. Также *A. brasilense* не имеет гомологов белка SefA (Debieux *et al.*, 2011), отвечающего за биоминерализацию селена бактерией *T. selenatis*. Таким образом, требуется дальнейшее изучение белков, ассоциированных с Se-НЧ, полученными с помощью бактерий рода *Azospirillum*.

3.5 Иммунохимический анализ биополимеров, выделенных с поверхности наночастиц селена, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7

Для дальнейшего исследования биополимеров, связанных с поверхностью Se-НЧ, мы использовали иммунохимические методы: дот-блот-анализ и иммуноферментный анализ в планшете. Были использованы

антитела к нативным клеткам штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245, а также антитела к липополисахариду (ЛПС) и флагеллину *A. brasilense* Sp7.

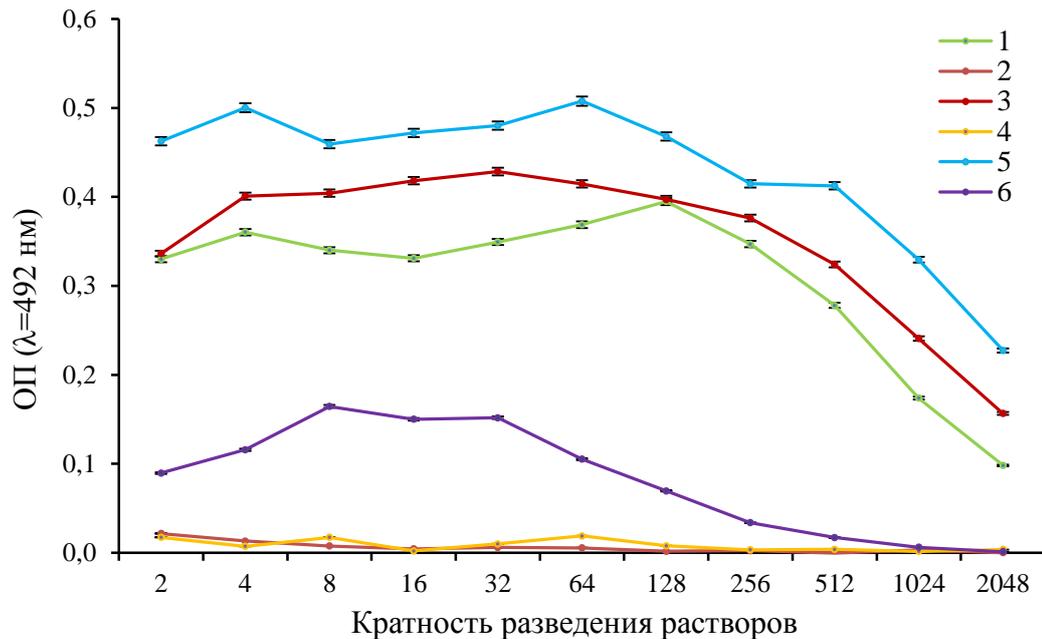
В дот-блот-анализе были протестированы Se-НЧ, полученные с помощью *A. brasilense* Sp7, и биополимеры, выделенные с их поверхности. Результаты показали наиболее сильное взаимодействие обоих препаратов с антителами к нативным бактериальным клеткам (рис. 21). В этом случае взаимодействие наблюдается даже при разбавлении исходных растворов в 10000 раз. В то же время с антителами к ЛПС и флагеллину Sp7 взаимодействие в разведениях в 1000 и 10000 раз гораздо слабее.



1 – Se-НЧ, полученные с помощью *A. brasilense* Sp7; 2 – белки, выделенные с поверхности Se-НЧ; А – Антитела (Ат) к живым клеткам *A. brasilense* Sp7; Б – Ат к флагеллину *A. brasilense* Sp7; В – Ат к ЛПС *A. brasilense* Sp7; Г – Ат к живым клеткам *A. brasilense* Sp245

Рисунок 21 – Дот-блот-анализ на нитроцеллюлозной мембране Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7, и биополимеров, выделенных с их поверхности

Также мы провели иммуноферментный анализ в планшете раствора биополимеров (концентрация белка – 43 мкг/мл), экстрагированных с поверхности Se-НЧ. Данный метод неприменим для исследования Se-НЧ, так как их суспензии окрашены в оранжевый цвет. Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) был проведен по стандартной методике, с теми же антителами, что и при дот-блот-анализе (рис. 22).



1 - Ат к живым клеткам *A. brasilense* Sp245; 2 – буфер; 3 – Ат к ЛПС *A. brasilense* Sp7; 4 – буфер; 5 – Ат к живым клеткам *A. brasilense* Sp7; 6 – Ат к флагеллину *A. brasilense* Sp7

Рисунок 22 – Иммуноферментный анализ (вариант ELISA) биополимеров, выделенных с поверхности Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7

Наиболее сильное взаимодействие выделенных биополимеров выявлено с антителами к нативным клеткам *A. brasilense* Sp7. Взаимодействие с антителами к ЛПС *A. brasilense* Sp7 фактически в 2 раза слабее. Реакция с антителами к нативным клеткам штамма *A. brasilense* Sp245 слабее в ~3 раза. В данном случае (как для результатов дот-блот-анализа) взаимодействие определяется перекрестной специфичностью антител к нативным клеткам штаммов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245.

Антитела к флагеллину *A. brasilense* Sp7 взаимодействовали в ~100 раз слабее, чем антитела к нативным клеткам *A. brasilense* Sp7, но это взаимодействие имело явно специфический характер: в диапазоне разведений от 32 до 1024 наблюдается пропорциональная зависимость снижения ОП от уменьшения концентрации исследуемого препарата. ОП растворов в лунках, в которые был нанесен экстрагирующий буфер, в реакциях ИФА со всеми антителами была близка к «фоновым» значениям.

Установлено, что в состав биополимерного слоя, экстрагированного 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 составе биополимеров присутствуют эпитопы как углеводных, так и белковых антигенов. Флагеллин *A. brasilense* Sp7 присутствует, но его содержание незначительно.

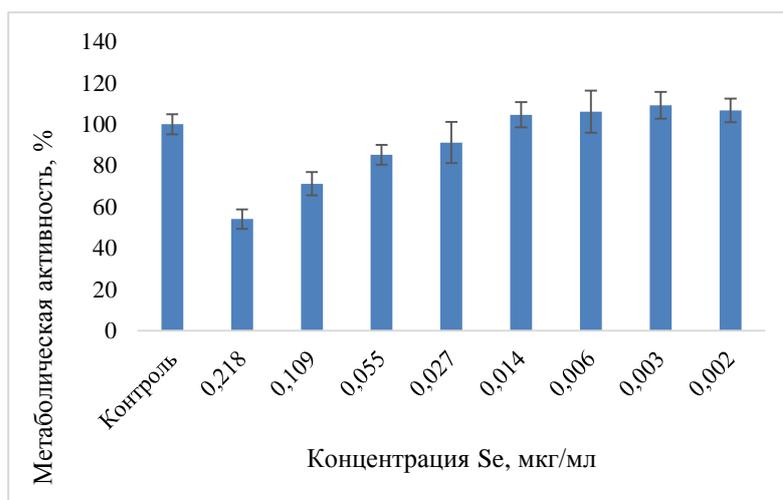
Таким образом, в состав биополимерного слоя, связанного с поверхностью Se-НЧ, входят белки и гликополимеры (ЛПС) поверхности бактериальных клеток, а также флагеллин. Это может свидетельствовать о том, что внеклеточная сборка Se-НЧ у азоспирилл может происходить с участием белков поверхности бактериальных клеток.

3.6 Влияние наночастиц селена, полученных с помощью штаммов *A. thiophilum* BV-S и *A. brasilense* Sp7, на метаболическую активность клеток культуры HeLa

Роль соединений селена в терапии рака изучалась во множестве эпидемиологических, преклинических и клинических исследований. Было показано, что важнейшими факторами, определяющими клиническую эффективность соединений селена, являются концентрация веществ и химическая форма селена (Suzuki *et al.*, 2010; Abdulah *et al.*, 2005; El-Bayoumy *et al.*, 2004). Элементарный селен в форме наночастиц, привлекает

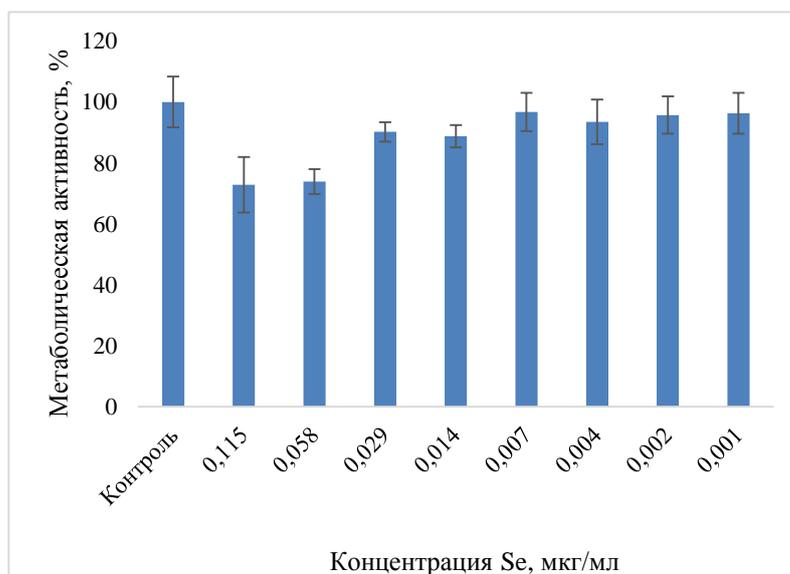
внимание своей высокой биологической активностью и малой токсичностью (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2011).

Был проведен анализ метаболической активности клеток карциномы шейки матки человека (HeLa) при росте в присутствии Se-НЧ, полученных с помощью бактерий рода *Azospirillum*. Выживаемость клеток оценивалась по их способности к трансформации красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) до формазана, имеющего фиолетовую окраску. Исследование выявило токсическое действие препаратов Se-НЧ, полученных с помощью обоих используемых штаммов. Как видно из рис. 23, клеточное дыхание культуры HeLa снижается на 46% по сравнению с контролем в присутствии Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7, и на 28% в присутствии Se-НЧ, полученных с помощью *A. thiophilum* BV-S (рис. 24). Из этого можно заключить, что Se-НЧ, полученные разными штаммами азоспирилл, имеют примерно одинаковую токсичность, так как концентрации суспензий Se-НЧ различаются примерно в такое же количество раз. Максимальная используемая концентрация Se, определенная с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии, в суспензиях Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7, составляла 0,218 мкг/мл, в полученных с помощью *A. thiophilum* BV-S – 0,115 мкг/мл.



Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка

Рисунок 23 – Изменение метаболической активности культуры клеток HeLa в присутствии Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7



Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка

Рисунок 24 – Изменение метаболической активности культуры клеток HeLa в присутствии Se-НЧ, полученных с помощью *A. thiophilum* BV-S

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования Se-НЧ, полученных с помощью бактерий рода *Azospirillum*, для разработки методов терапии раковых заболеваний.

3.7 Изучение механизмов восстановления Na_2SeO_3 азоспириллами

Восстановление селенит-ионов бактериями может происходить при участии различных ферментативных путей как внутри, так и вне клеток. Ранее для штаммов *A. brasilense* Sp245 и Sp7 (Tugarova *et al.*, 2014) было показано, что при выращивании этих бактерий в присутствии Na_2SeO_3 Se-НЧ находятся преимущественно внутри бактериальных клеток. При этом при добавлении Na_2SeO_3 в надосадочную жидкость, содержащую различные низко- и высокомолекулярные биологические соединения, экскретируемые бактериями во внеклеточное пространство, восстановления не происходило. Также было показано, что азоспириллы, росшие в присутствии селенита, накапливают значительное количество селена внутри клеток (режим ESI ПЭМ, Tugarova *et al.*, 2014). При росте бактерий на твердой среде с

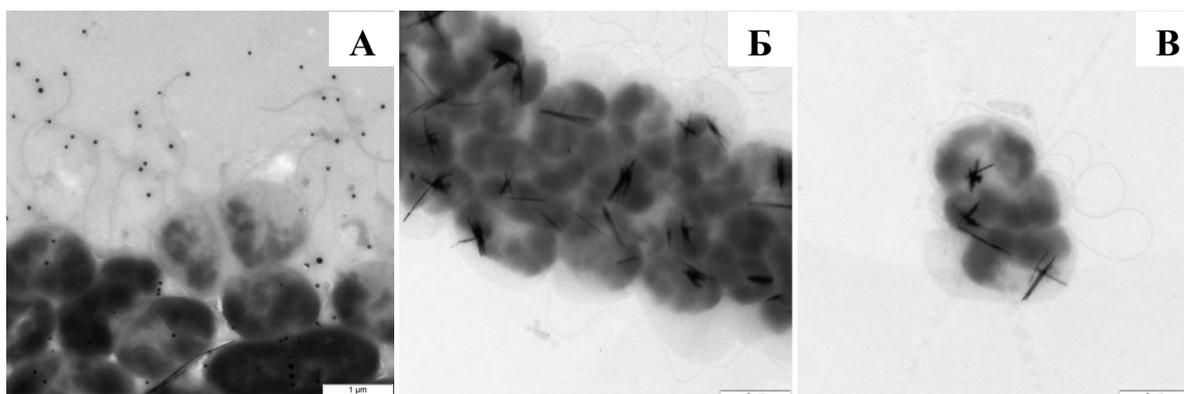
добавлением Na_2SeO_3 можно наблюдать окрашенные колонии, причем окрашивание наблюдается только внутри клеточных колоний.

Нами было предложено для исследования восстановления селенит-ионов азоспириллами инкубировать отмытые от компонентов среды бактерии в присутствии SeO_3^{2-} в ФР. В таких условиях количество клеток значительно больше, и рост бактерий останавливается за счет ограничения питательных компонентов среды. Было показано, что в такой системе восстановление селенит-ионов происходит намного быстрее, чем при росте в присутствии селенита. Изучение восстановления селенит-ионов в такой системе также представляется более выгодным, так как в качестве среды, в которой содержатся клетки, выступает ФР, и исключается влияние других компонентов, кроме NaCl . Данная система была использована нами в дальнейших исследованиях как модельная.

3.7.1 Протонзависимый транспорт

Для определения роли протонзависимого транспорта в процессе восстановления селенит-ионов у азоспирилл мы использовали ингибитор протонной помпы КЦХФ. Клетки штамма *A. brasilense* Sp245, выращенные до поздней логарифмической фазы, сконцентрированные и отмытые от компонентов среды, были обработаны КЦХФ (конечные концентрации 10 и 25 мкМ) в течение 50 мин, а затем отмыты от ингибитора. Ранее было показано, что такие концентрации полностью ингибируют протонзависимый транспорт у *A. brasilense* Sp245 (Shelud'ko *et al.*, 2012). Далее клетки инкубировали в ФР присутствии 10 мМ Na_2SeO_3 в термостате при 32°C в течение 24 ч. При высеве обоих штаммов на питательную среду показано, что обработка ингибитором не влияет на их жизнеспособность.

Как видно на микрофотографиях ПЭМ, восстановление селенит-ионов при инкубации клеток штамма *A. brasilense* Sp245 в присутствии селенита без обработки КЦХФ и после обработки различается (рис. 25).



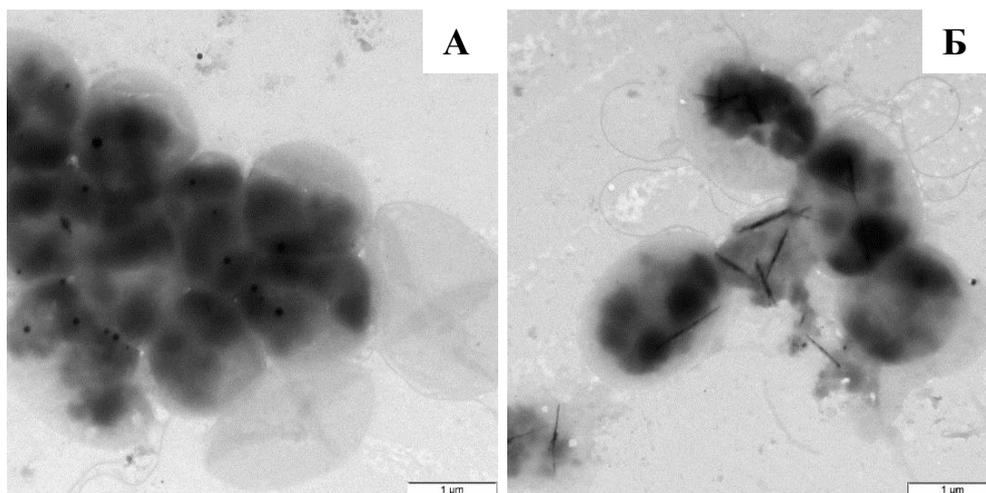
А – клетки без обработки КЦХФ; Б – клетки, обработанные 10 мкМ КЦХФ; В – клетки, обработанные 25 мкМ КЦХФ. Бар – 200 нм.

Рисунок 25 – Влияние КЦХФ на клетки *A. brasilense* Sp245, инкубированные в течение 24 ч в присутствии 10 мМ Na_2SeO_3

Клетки *A. brasilense* Sp245, не обработанные КЦХФ, восстанавливали селенит с образованием экстраклеточных сферических Se-НЧ. На микрофотографиях образцов, прошедших обработку КЦХФ, Se-НЧ отсутствовали. При этом наблюдались многочисленные включения игловидных кристаллов Se^0 внутри клеток (рис. 25Б, 25В).

Для штамма *A. brasilense* Sp7 были показаны аналогичные результаты: восстановление селенита при обработке КЦХФ отмытых клеточных суспензий происходило с образованием кристаллов, а в суспензиях, не обработанных данным ингибитором, наблюдалось образование Se-НЧ (рис. 26). При этом следует отметить, что ранее у этого штамма мы наблюдали редкие единичные кристаллы при высоких концентрациях селенита (раздел 3.2).

Отсутствие Se-НЧ в образцах, обработанных КЦХФ, и внутриклеточное скопление Se^0 в виде кристаллов свидетельствует о том, что при поглощении селенита клетками азоспирилл протонзависимый транспорт не задействован; системы, участвующие в восстановлении SeO_3^{2-} , локализованы в цитоплазме или периплазме; далее с участием протонзависимого транспорта происходит вынос зародышей Se-НЧ за пределы клетки, где и осуществляется сборка Se-НЧ. При блокировании протонзависимого транспорта зародыши Se^0 скапливаются внутри клеток, в результате формируя кристаллы.



А – клетки без обработки КЦХФ; Б – клетки после обработки 10 мкМ КЦХФ

Рисунок 26 – Влияние КЦХФ на клетки *A. brasilense* Sp7, инкубированные в течение 24 ч в присутствии 10 мМ Na₂SeO₃

При изучении восстановления Na₂SeO₃ для бактерии *Clostridium pasteurianum* было показано, что транспорт селенит-ионов внутрь бактериальной клетки происходит с помощью протонного симпорта. Было показано, что добавление КЦХФ ингибирует поглощение селенит-ионов данной бактерией (Bryant & Laishley, 1989). Добавление КЦХФ в культуральную среду также ингибирует транспорт SeO₃²⁻ для бактерии *Selenomonas ruminantium* (Hudman & Glenn, 1984).

Полученные результаты дают основания полагать, что в процесс поглощения селенита клетками изученных нами штаммов протонзависимый транспорт не включается, восстановление ионов SeO₃²⁻ 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 Se⁰ скапливается внутри клеток в виде кристаллов.

3.7.2 Индукция белков клеточной поверхности бактерий и периплазмы в присутствии селенита

При росте бактерий в присутствии селенита может наблюдаться индукция отдельных белков в ответ на действие селенит-ионов. Так, было показано, что у *R. sphaeroides* в присутствии селенита происходит индукция синтеза шаперонов, факторов элонгации и белков, связанных с окислительным стрессом, при этом главным токсическим эффектом селенита для этой бактерии является формирование активных форм кислорода в процессе его метаболизма (Bebien *et al.*, 2001). В другой работе была показана индукция синтеза 46 белков в присутствии селенита у *E. coli*, при этом была определена важная роль антиоксидантных белков, таких как супероксиддисмутаза (Bebien *et al.*, 2002).

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 Na_2SeO_3 в диапазоне концентраций 0,05–5 мМ в течение 7 сут. На белковых профилях бактерий, выращенных в присутствии Na_2SeO_3 наблюдается усиление полосы в области ~41 кДа с увеличением концентрации селенита до 1 мМ, отсутствующей на профиле контрольной культуры (рис. 27). Это говорит об индукции синтеза белка в присутствии селенита.

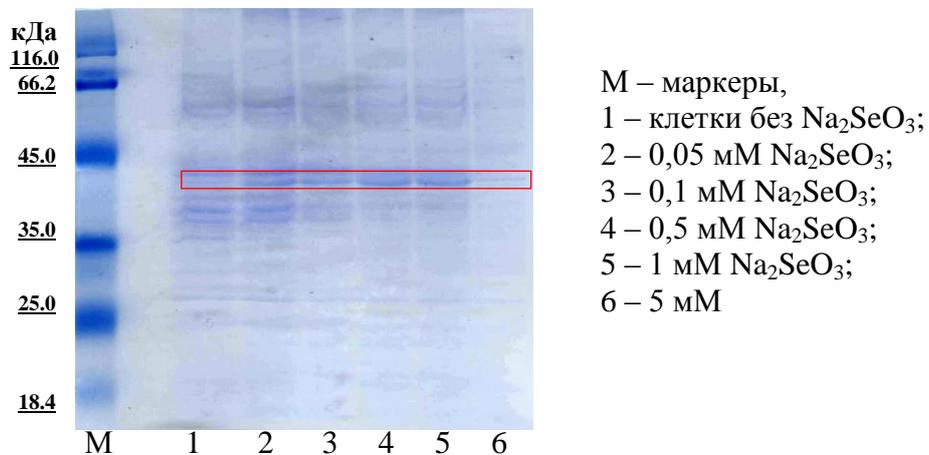


Рисунок 27 – Электрофоретический профиль белков периплазмы и клеточной поверхности *A. brasilense* Sp7 (рост 7 сут)

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.

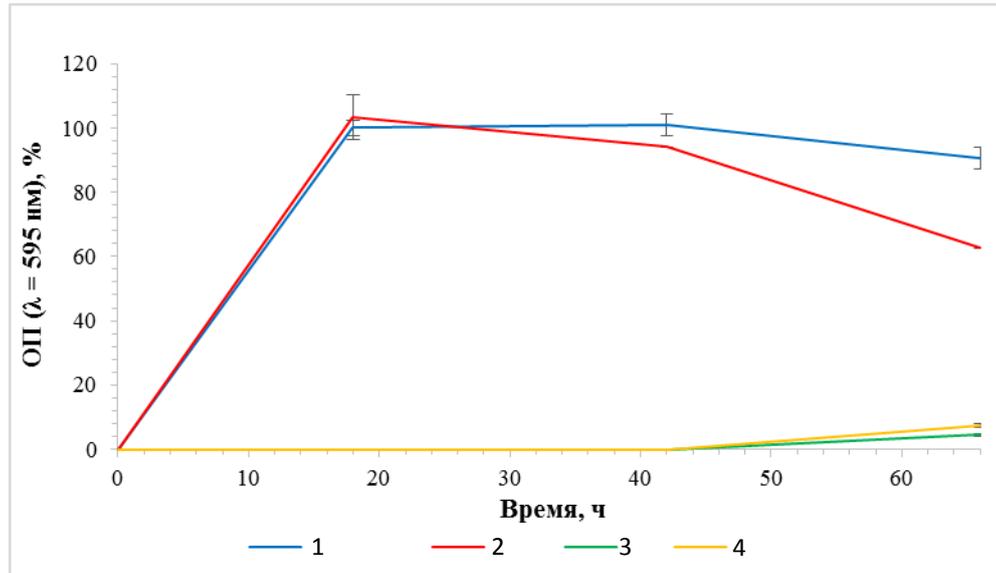
3.7.3 Редокс-система глутатиона

Восстановление селенит-ионов – главная стадия в детоксификации соединений селена бактериями. Основным механизмом защиты от селенит-ионов у бактерий считаются реакции с соединениями, содержащими тиоловые группы, приводящие к восстановлению этих окисленных соединений до элементарного селена, не проявляющего токсических свойств (Painter, 1941). Мы проверили возможность восстановления селенит-ионов азоспириллами с помощью редокс-системы глутатиона.

Круг бактерий, способных к синтезу глутатиона, ограничивается α -, β -, γ -протеобактериями и цианобактериями (Newton & Fahey, 1989). Бактерии рода *Azospirillum* относятся к α -протеобактериям и способны к синтезу глутатиона (последовательность аминокислот глутатионсинтетазы для *A. brasilense* Sp7 депонирована в базе данных UniProtKB/TrEMBL под кодом A0A0P0EKD6). Для определения роли глутатиона в восстановлении Na_2SeO_3 азоспириллами было проведено сравнение восстановления селенит-ионов бактерией *A. brasilense* Sp7 без (контроль) и в присутствии БСО, ингибитора γ -глутамилцистеинсинтетазы, ключевого фермента синтеза глутатиона. Рост *S. maltophilia* SeITE02 (Blake *et al.*, 1993; Antonioli *et al.*, 2007) и *Rs. rubrum* (Kessi, 2006) в присутствии селенита и БСО заметно ингибировался по сравнению с ростом в отсутствие последнего, что указывает на участие глутатиона у этих бактерий в восстановлении селенита, позволяя им преодолевать его токсическое действие.

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 (рис. 28).



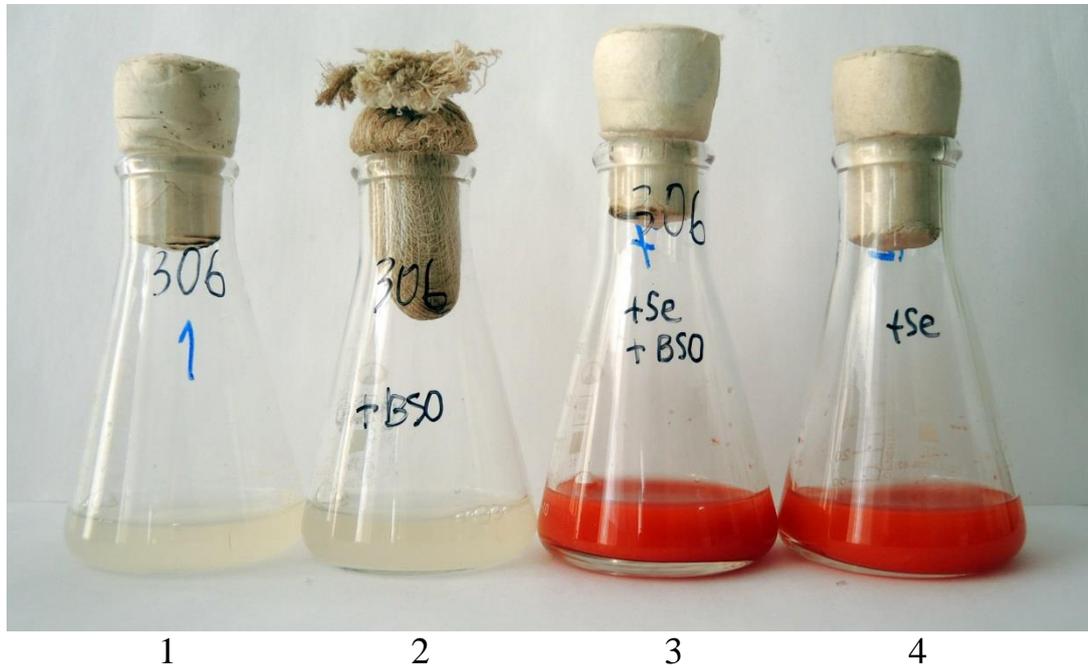
Данные представлены в % от ОП контрольной культуры (100%) на 18 ч роста ± стандартная ошибка; 1 – клетки, росшие без добавления Na₂SeO₃ и БСО; 2 – с добавлением 2 мМ БСО; 3 – с добавлением 2 мМ Na₂SeO₃; 4 – с добавлением 2 мМ Na₂SeO₃ и 2 мМ БСО

Рисунок 28 – Влияние БСО на рост культуры *A. brasilense* Sp7 в присутствии Na₂SeO₃ в течение 3 сут

Рост *A. brasilense* Sp7 в присутствии БСО ингибировался по сравнению с ростом контрольной культуры не более чем на 6% после 2 сут. Слабое окрашивание бактериальных суспензий, свидетельствующее о восстановлении селенит-ионов до элементарного селена, появлялось после 3 сут роста. На восстановлении селенит-ионов добавление БСО фактически не отражалось. Окрашивание бактериальных культур, содержащих в среде селенит, становилось интенсивным на 6 сут и не различалось в культурах, росших в присутствии БСО и без него (рис. 29). Таким образом, динамика роста и интенсивность окрашивания суспензий не отличались у бактериальных суспензий, выращиваемых в присутствии только селенита и в присутствии селенита и БСО.

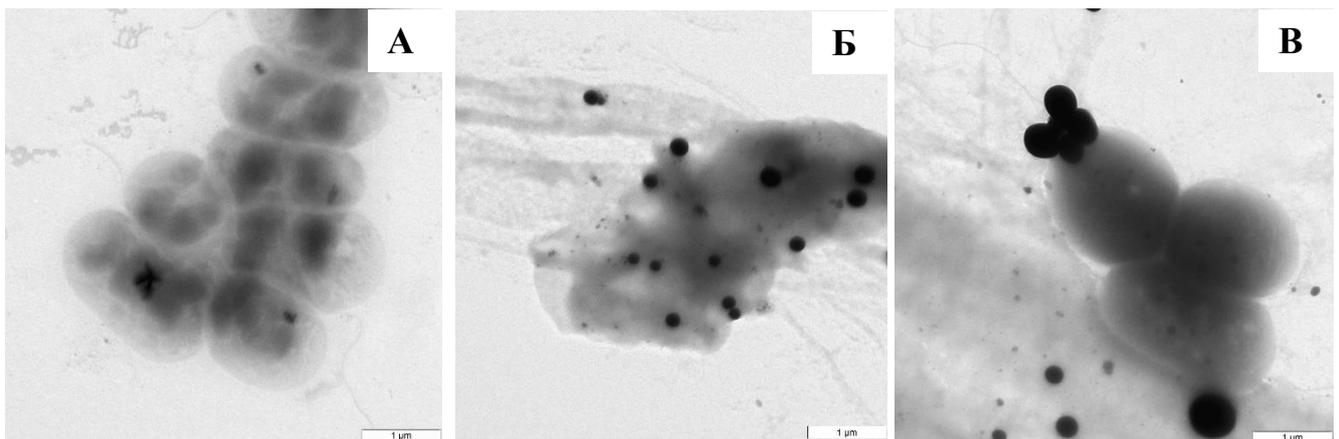
Результаты ПЭМ для исследуемых бактериальных культур на 6 сут показали наличие Se-НЧ в обоих вариантах с Na₂SeO₃: как в присутствии, так и в отсутствие БСО (рис. 30). Таким образом, можно сделать вывод, что

присутствие БСО в среде не влияет на восстановление селенит-ионов у *A. brasiliense* Sp7. Аналогичные результаты были получены при инкубации бактериальных клеток в присутствии БСО.



1 – контроль, культура без добавления БСО и Na_2SeO_3 , 2 – в присутствии 2 мМ БСО, 3 – в присутствии 2 мМ БСО и 2 мМ Na_2SeO_3 , 4 – в присутствии 2 мМ Na_2SeO_3

Рисунок 29 – Восстановление Na_2SeO_3 культурой *A. brasiliense* Sp7 в присутствии БСО на 6-е сут роста



А – Клетки без Na_2SeO_3 и БСО; Б – в присутствии 2 мМ Na_2SeO_3 ; В – в присутствии 2 мМ Na_2SeO_3 и 2 мМ БСО. Бар – 1 мкм

Рисунок 30 – Микрофотографии ПЭМ клеток *A. brasiliense* Sp7, росших в течение 6 сут

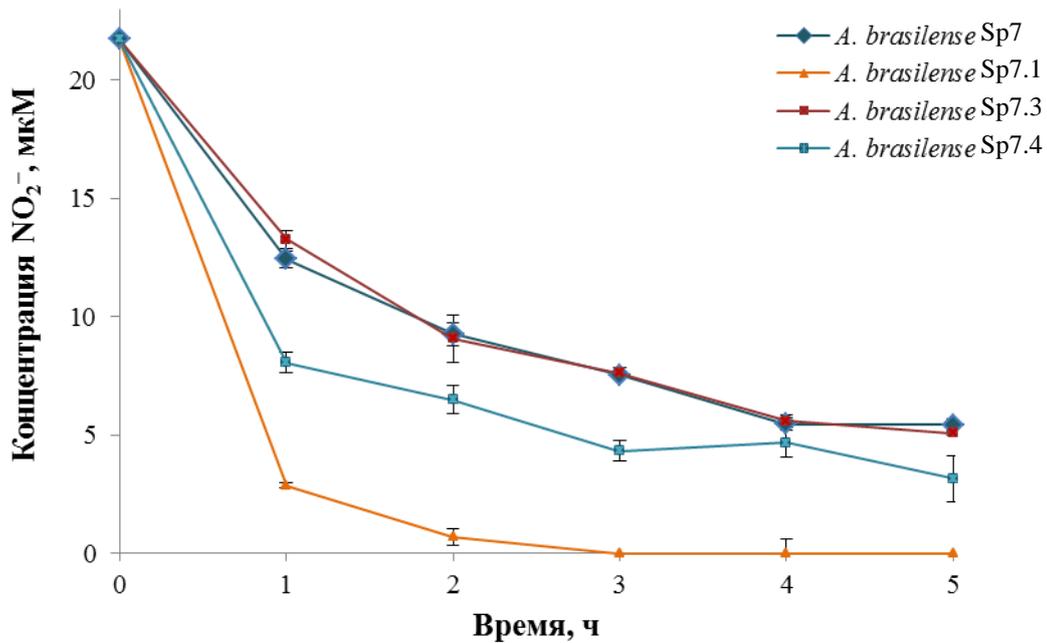
Исходя из данных, полученных при выращивании бактериальных клеток в присутствии БСО и без него, можно сделать вывод, что включение глутатиона в восстановление селенит-ионов не является основным путем их детоксификации у *A. brasilense* Sp7.

3.7.4 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 и, соответственно, имеют гены, отвечающие за синтез как нитрит-, так и нитратредуктаз (Bashan *et al.*, 2004). 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 (Петрова с соавт., 2005; Кацы и Петрова, 2015), которые имеют различия в скорости нитритредукции: *A. brasilense* Sp7.1 (максимальная), *A. brasilense* Sp7.3 (минимальная, сопоставимая со скоростью *A. brasilense* Sp7) и *A. brasilense* Sp7.4 (промежуточная). Выращенные до поздней логарифмической стадии, отмытые и сконцентрированные бактериальные клетки штамма *A. brasilense* Sp7 и его производных инкубировали с 5 мМ Na₂SeO₃. Скорость восстановления селенита контролировали по изменению окраски. Параллельно измеряли скорость нитритредукции этих же штаммов.

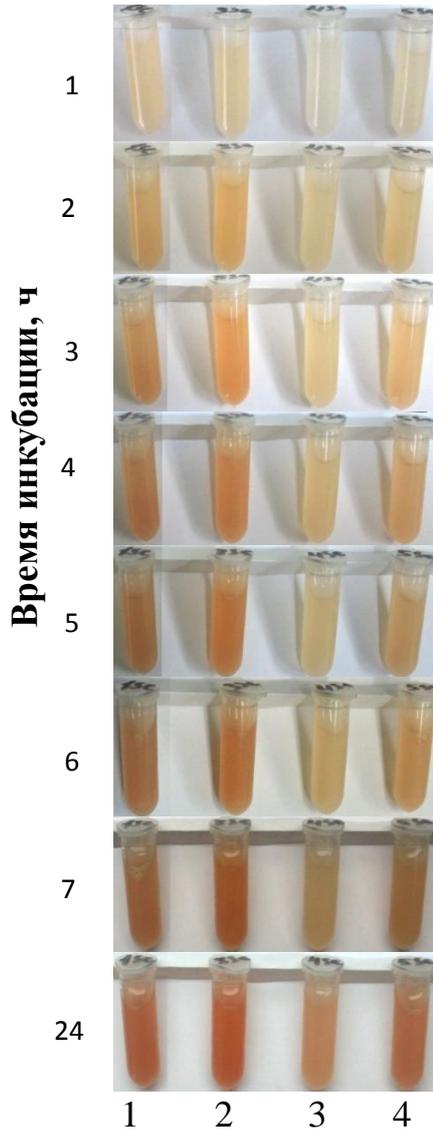
Как видно из рис. 31, самую высокую скорость восстановления нитрит-ионов имеет производный *A. brasilense* Sp7.1. Также более высокую скорость восстановления по сравнению с *A. brasilense* Sp7 показывает производный *A. brasilense* Sp7.4. Скорость восстановления нитрит-ионов производным *A. brasilense* Sp7.3 фактически совпадала с таковой для *A. brasilense* Sp7.



На графиках представлены среднее \pm стандартная ошибка.

Рисунок 31 – Восстановление нитрит-ионов *A. brasilense* Sp7 и его производными (исходная концентрация NaNO_2 – 1,5 мкг/мл)

Восстановление селенит-ионов у производных тоже различалось. Скорость восстановления Na_2SeO_3 оценивали по интенсивности окраски бактериальных суспензий. Как видно из рис. 32, наиболее быстро развивается окраска суспензии, а следовательно, и восстановление селенита, у *A. brasilense* Sp7.1, имеющего самую высокую скорость восстановления нитрит-ионов. Слабое окрашивание развивалось уже через 1 ч инкубации у штамма *A. brasilense* Sp7, а также его производных *A. brasilense* Sp7.1 и Sp7.4. Интенсивность окрашивания заметно возростала на второй час. Окрашивание суспензии бактериальных клеток *A. brasilense* Sp7.3 имеет наименьшую интенсивность среди всех исследуемых образцов. Различия в интенсивности восстановления селенита сохраняются на протяжении всего времени инкубации.

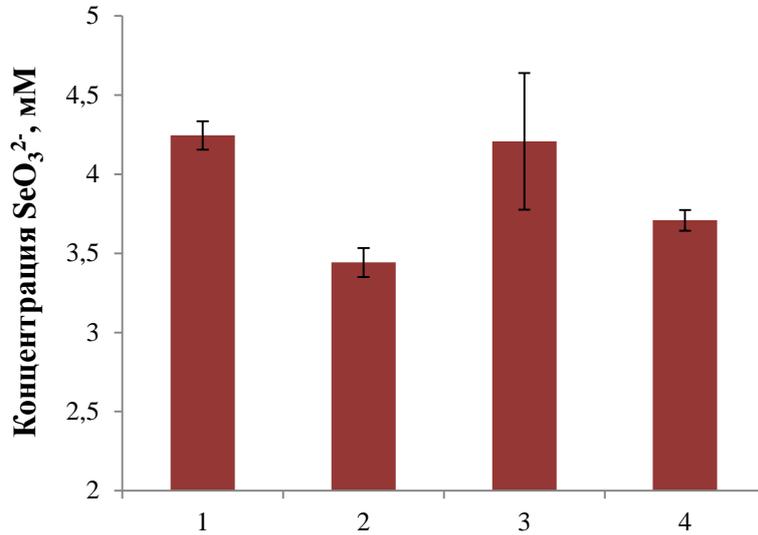


1 – *A. brasilense* Sp7; 2 – *A. brasilense* Sp7.1; 3 – *A. brasilense* Sp7.3; 4 – *A. brasilense* Sp7.4

Рисунок 32 – Бактериальные суспензии, инкубированные в присутствии 5 мМ Na_2SeO_3 в течение 24 ч

Для более точной оценки количества восстановленного SeO_3^{2-} была определена его концентрация в культуральной жидкости исследуемых образцов (рис. 33) после 24 ч инкубации (при исходной концентрации 5 мМ). По сравнению со штаммом *A. brasilense* Sp7, производным *A. brasilense* Sp7.1 восстановлено в 2 раза больше SeO_3^{2-} (снижение концентрации селенит-ионов для *A. brasilense* Sp7 составило 0,8 мМ, для *A. brasilense* Sp7.1 – 1,6 мМ), а производным Sp7.4 – в ~1,6 раза больше (снижение концентрации SeO_3^{2-} составило 1,3 мМ). Скорости восстановления селенита штаммом *A.*

brasilense Sp7 и его производным *A. brasilense* Sp7.3, судя по остаточным концентрациям SeO_3^{2-} через 24 ч инкубации, фактически не отличались (см. рис. 33), что соответствует также и одинаковой скорости нитритредукции данных двух штаммов (см. выше, рис. 31).



1 – *A. brasilense* Sp7; 2 – *A. brasilense* Sp7.1; 3 – *A. brasilense* Sp7.3; 4 – *A. brasilense* Sp7.4. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка.

Рисунок 33 – Концентрация селенита в надосадке после 24 ч инкубации *A. brasilense* Sp7 и его производных в присутствии 5 мМ селенита

Таким образом, наименьшая остаточная концентрация селенита была в случае производного с максимальной скоростью нитритредукции, соответственно, наибольшая – с минимальной (рис. 33). Полученные результаты свидетельствуют о том, что восстановление селенит-ионов у азоспирилл происходит с участием процессов денитрификации. Данный феномен, впервые выявленный для азоспирилл, требует дальнейшего исследования.

Мы предполагаем, что процесс бактериального синтеза Se-НЧ может включать несколько стадий: (1) транспорт селенит-ионов внутрь клетки; (2) непосредственно восстановление селенит-ионов; (3) экспорт зародышей Se^0 ; (4) непосредственно сборка Se-НЧ. Транспорт селенит-ионов в клетку не требует специфических переносчиков, он может происходить с помощью

сульфатпермеаз или, например, переносчиков многоатомных спиртов. Следует отметить, что стадии (1) и (3) не обязательны, что зависит от локализации восстановления селенита и формирования Se-НЧ. Восстановление SeO_3^{2-} может происходить по различным механизмам, описанным в главе 1.2.2. Оно может происходить как внутри клетки, так и во внеклеточном пространстве с участием веществ, синтезируемых клетками и экскретируемых в среду. Процесс сборки Se-НЧ выяснен не до конца. В некоторых работах предполагают, что сборка происходит в результате физико-химических процессов, таких как Оствальдовское созревание (Lampis *et al.*, 2014 Kaur *et al.*, 2009; Nancharaiiah & Lens, 2015). Также она может происходить при помощи различных биомолекул. Например, было показано, что при определенном мольном соотношении Na_2SeO_3 /БСА развернутая молекула БСА выступает в роли матрицы, размещая на себе максимальное количество центров нуклеации, при этом способствуя Оствальдовскому созреванию наночастиц (Kaur *et al.* 2009). Этот процесс может происходить как внутри клетки, так и во внеклеточной среде. При внутриклеточном формировании Se-НЧ вынос происходит, вероятно, путем лизиса бактериальной клетки (Lampis *et al.*, 2014). При внеклеточном – вероятно, происходит вынос зародышей Se-НЧ (Se^0 , полученного в результате внутриклеточного восстановления) перед внеклеточной сборкой Se-НЧ.

Таким образом, на основании полученных данных мы предполагаем, что процесс восстановления селенит-ионов у азоспирилл при инкубации в присутствии Na_2SeO_3 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. zeaе*, *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 Na₂SeO₃.

2. Разработана оригинальная методика синтеза Se-НЧ с использованием бактерий вида *A. brasilense*, позволяющая получить Se-НЧ с экстраклеточной локализацией. Подобраны оптимальные условия (концентрации Na₂SeO₃, время инкубации, плотность культуры, pH среды) для синтеза Se-НЧ. Размер и однородность Se-НЧ зависели от концентрации селенита в среде. Оптимальная концентрация Na₂SeO₃ 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. Se⁰ 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_3^{2-} у азоспирилл.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научным руководителям – к.б.н. А.В. Тугаровой и д.х.н., профессору А.А. Камневу – за внимание, консультации, постоянную поддержку и помощь в планировании, проведении, обсуждении и оформлении экспериментальной работы. Автор выражает благодарность за помощь сотрудникам ИБФРМ РАН: Ю.А. Дятловой – в проведении ИК-фурье-спектроскопических исследований, д.ф.-м.н. Б.Н. Хлебцову – при выполнении анализов методом СКР, к.ф.-м.н. В.А. Ханадееву – в характеристике полученных образцов с использованием метода ДРС, к.б.н. Е.В. Любунь – в проведении атомно-абсорбционной спектрометрии, к.б.н. А.С. Фомину – в определении цитотоксичности в отношении культуры клеток HeLa, к.х.н. А.М. Бурову – в проведении просвечивающей электронной микроскопии и к.б.н. Г.Л. Бурыгину – в проведении иммунохимического исследования образцов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЦ	–	ацетат целлюлозы
БСА	–	бычий сывороточный альбумин
БСО	–	бутионинсульфоксимин
ДРС	–	динамическое рассеяние света
ДСН	–	додецилсульфат натрия
ИКФС	–	инфракрасная фурье-спектроскопия
КЦХФ	–	карбонилцианид- <i>m</i> -хлорофенилгидразон
ОП	–	оптическая плотность
ПВДФ	–	поливинилиденфторид
ПЭМ	–	просвечивающая электронная микроскопия
ПЭС	–	полиэфирсульфон
СКР	–	спектроскопия комбинационного рассеяния
СМС	–	синтетическая малатная среда
СЭМ		сканирующая электронная микроскопия
ФР	–	физиологический раствор (0,85% водный хлорид натрия)
ФСБ	–	фосфатно-солевой буфер
HeLa	–	клетки карциномы шейки матки человека
GSH		глутатион
GS-Se-SG	–	селенодиглутатион
Se-НЧ	–	наночастицы селена

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бурьгин Г.Л., Широков А.А., Шелудько А.В., Кацы Е.И., Щеголев С.Ю., Матора Л.Ю. Выявление чехла на поверхности полярного жгутика *Azospirillum brasilense* // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – № 6. – С. 822–829.
2. Гусева О.И. Антропогенное загрязнение городов Алтайского края // Материалы Международной конференции «Биоразнообразие, проблемы экологии Горного Алтая и сопредельных регионов». – 2008. – С. 34.
3. Кацы Е.И., Петрова Л.П. Геномные перестройки у *Azospirillum brasilense* Sp7 с участием плазмиды pRhico и профага ФAb-Cd // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 12. – С. 1351–1358.
4. Муратова А.Ю., Турковская О.В., Антонюк Л.П., Макаров О.Е., Позднякова Л.И., Игнатов В.В. Нефтеокисляющий потенциал ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – № 2. – С. 248–254.
5. Петрова Л.П., Борисов И.В., Кацы Е.И. Плазмидные перестройки у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – № 4. – С. 572–574.
6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Учебное пособие / под. ред. Н.С. Егорова – М.: Изд-во МГУ, 1995. – С. 122–124.
7. Тугарова А.В., Ветчинкина Е.П., Лощинина Е.А., Щелочков А.Г., Никитина В.Е., Камнев А.А. Способность ризобактерии *Azospirillum brasilense* к восстановлению селена(IV) до селена(0) // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 3. – С. 362–365.
8. Шелудько А.В., Широков А.А., Соколова М.К., Соколов О.И., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – № 5. – С. 696–704.
9. Abdulah R., Miyazaki K., Nakazawa M., Koyama H. Effects of selenium supplementation on four agricultural crops // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2005. – Vol. 19. – P. 141–150.

10. Afkar E., Lisak J., Saltikov C., Basu P., Oremland R.S., Stolz J.F. The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10 // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – Vol. 226. – N. 1. – P. 107–112.
11. Aguilar-Barajas E., Díaz-Pérez C., Ramírez-Díaz M.I., Riveros-Rosas H., Cervantes C. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions // Biometals. – 2011. – Vol. 24. – N. 4. – P. 687–707.
12. Anastas P.T., Kirchhoff M.M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry // Acc. Chem. Res. – 2002. – Vol. 35. – N. 9. – P. 686–694.
13. Anastas P.T., Warner J.C. Green Chemistry: Theory and Practice // Oxford University Press, New York, 1998. – P. 30.
14. Antonioli P., Lampis S., Chesini I., Vallini G., Rinalducci S., Zolla L., Righetti P.G. *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02, a new bacterial strain suitable for bioremediation of selenite-contaminated environmental matrices // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73. – N. 21. – P. 6854–6863.
15. Avazeri C., Turner R.J., Pommier J., Weiner J.H., Giordano G., Vermeglio A. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite // Microbiology. – 1997. – Vol. 143. – N. 4. – P. 1181–1189.
16. Avoscan L., Carrière M., Proux O., Sarret G., Degrouard J., Covès J., Gouget B. Enhanced selenate accumulation in *Cupriavidus metallidurans* CH34 does not trigger a detoxification pathway // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75. – N. 7. – P. 2250–2252.
17. Baesman S.M., Stolz J.F., Kulp T.R., Oremland R.S. Enrichment and isolation of *Bacillus beveridgei* sp. nov., a facultative anaerobic haloalkaliphile from Mono Lake, California that respire oxyanions of tellurium, selenium, and arsenic // Extremophiles. – 2009. – Vol. 13. – N. 4. – P. 695–705.
18. Bai Y., Qin B.Y., Zhou Y.H., Wang Y.D., Wang Z., Zheng W.J. Preparation and antioxidant capacity of element selenium nanoparticles sol-gel compounds // Nanosci. Nanotechnol. – 2011. – Vol. 11. – P. 5012–5017.

19. Bajaj M., Schmidt S., Winter J. formation of Se (0) nanoparticles by *Duganella* sp. and *Agrobacterium* sp. isolated from Se-laden soil of North-East Punjab, India // *Microb. Cell Fact.* – 2012. – Vol. 11. – N. 1. – P. 64–78.
20. Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // *Can. J. Microbiol.* – 1983. – Vol. 29. – N. 8. – P. 924–929.
21. Bao P., Xiao K.Q., Wang H.J., Xu H., Xu P.P., Jia Y., Häggblom M.M., Zhu Y.G. Characterization and Potential Applications of a Selenium Nanoparticle Producing and Nitrate Reducing Bacterium *Bacillus oryzae* sp. nov. // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 34054.
22. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1767. – N. 9. – P. 1073–1101.
23. Barton L.L., Fauque G.D. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 68. – P. 41–98.
24. Bashan Y., de-Bashan L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment // *Adv. Agron.* – 2010. – Vol. 108. – P. 77–136.
25. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) // *Can. J. Microbiol.* – 2004. – Vol. 50. – N. 8. – P. 521–577.
26. Bebien M., Chauvin J.P., Adriano, J.M., Grosse S., Verméglio A. Effect of selenite on growth and protein synthesis in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. – N. 10. – P. 4440–4447.
27. Bebien M., Kirsch J., Mejean V., Verméglio A. Involvement of a putative molybdenum enzyme in the reduction of selenate by *Escherichia coli* // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148. – N. 12. – P. 3865–3872.
28. Beekes M., Lasch P., Naumann D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research // *Vet. Microbiol.* – 2007. – Vol. 123. – N. 4. – P. 305–319.

29. Beheshti N., Soflaei S., Shakibaie M., Yazdi M.H., Ghaffarifar F., Dalimi A., Shahverdi A.R. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: in vitro and in vivo studies // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2013. – Vol. 27. – N. 3. – P. 203–207.
30. Belimov A.A., Dietz K. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations // Microbiol. Res. – 2000. – Vol. 155. – N. 2. – P. 113–121.
31. Bernas T., Dobrucki J.W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – Vol. 380. – N. 1. – P. 108–116.
32. Bertani G. Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1951. – Vol. 62. – N. 3. – P. 293.
33. Birringer M., Pilawa S., Flohé L. Trends in selenium biochemistry // Nat. Prod. Rep. – 2002. – Vol. 19. – P. 693–718.
34. Blake R.C., Choate D.M., Bardhan S., Revis N., Barton L.L., Zocco T.G. Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site // Environ. Toxicol. Chem. – 1993. – Vol. 12. – N. 8. – P. 1365–1376.
35. Blum J.S., Bindi A.B., Buzzelli J., Stolz J.F., Oremland R.S. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov. and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic // Arch. Microbiol. – 1998. – Vol. 171. – N. 1. – P. 19–30.
36. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
37. Bryant R.D., Laishley E.J. Evidence for proton motive force dependent transport of selenite by *Clostridium pasteurianum* // Can. J. Microbiol. – 1989. – Vol. 35. – N. 4. – P. 481–486.
38. Buchs B., Evangelou M.W.H., Winkel L.H.E., Lenz M. Colloidal properties of nanoparticulate biogenic selenium govern environmental fate and

bioremediation effectiveness // Environ. Sci. Technol. – 2013. – Vol. 47. – N. 5. – P. 2401–2407.

39. Butler C.S., Debieux C.M., Dridge E.J., Splatt P., Wright M. Biomineralization of selenium by the selenate-respiring bacterium *Thauera selenatis* // Biochem. Soc. Trans. – 2012. – Vol. 40. – N. 6. – P.1239–1243.

40. Chapman P.M., Adams W.J., Brooks M., Delos C.G., Luoma S.N., Maher W.A., Ohlendorf H.M., Presser T.S., Shaw P. Ecological assessment of selenium in the aquatic environments. – SETAC Press, Pensacola, 2010. – 368 P.

41. Chasteen T.G., Bentley R. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants // Chem. Rev. – 2002. – Vol. 103. – N. 1. – P. 1–26.

42. Chau Y.K., Wong P.T.S., Silverberg B.A., Luxon P.L., Bengert G.A. Methylation of selenium in the aquatic environment // Science. – 1976. – Vol. 192. – N. 4244. – P. 1130–1131.

43. Chen T., Wong Y.S. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis* // J. Agric. Food Chem. – 2008. – Vol. 56. – N. 12. – P. 4352–4358.

44. Chocat P., Esaki N., Nakamura T., Tanaka H., Soda K. Microbial distribution of selenocysteine lyase // J. Bacteriol. – 1983. – Vol. 156. – N. 1. – P. 455–457.

45. Collection of Rhizosphere Microorganisms WDCM Registration № 1021. – URL: www.collection.ibppm.ru (дата обращения: 05.09.2019).

46. Cox J.C., Edwards E.S., DeMoss J.A. Resolution of distinct selenium-containing formate dehydrogenases from *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1981. – Vol. 145. – N. 3. – P. 1317–1324.

47. Cutter G.A., Bruland K.W. The marine biogeochemistry of selenium: a re-evaluation // Limnol. Oceanogr. – 1984. – Vol. 29. – P. 1179–1192.

48. de Souza M.P., Huang C.P.A., Chee N., Terry N. Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants // Planta. – 1999. – Vol. 209. – N. 2. – P. 259–263.

49. de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Morey T., Bashan Y. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater // *Water Res.* – 2004. – Vol. 38. – N. 2. – P. 466–474.
50. Debieux C.M., Dridge E.J., Mueller C.M., Splatt P., Paszkiewicz K., Knight I., Florance H., Love J., Titball R.W., Lewis R.J., Richardson D.J., Butler C.S. A bacterial process for selenium nanosphere assembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2011. – Vol. 108. – N. 33. – P. 13480–13485.
51. DeMoll-Decker H., Macy J.M. The periplasmic nitrite reductase of *Thauera selenatis* may catalyze the reduction of selenite to elemental selenium // *Arch. Microbiol.* – 1993. – Vol. 160. – N. 3. – P. 241–247.
52. Dhanjal S., Cameotra S.S. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil // *Microb. Cell Fact.* – 2010. – Vol. 9. – N. 1. – P. 52–53.
53. Dietrichs D., Meyer M., Rieth M., Andreesen J.R. Interaction of selenoprotein PA and the thioredoxin system, components of the NADPH-dependent reduction of glycine in *Eubacterium acidaminophilum* and *Clostridium litorale* // *J. Bacteriol.* – 1991. – 173. – P. 5983–5991.
54. Ding G.B., Nie R.H., Lv L.H., Wei G.Q., Zhao L.Q. Preparation and biological evaluation of a novel selenium-containing exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613 // *Carbohydr. Polym.* – 2014. – Vol. 109. – P. 28–34.
55. Döbereiner J., Day J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. Symposium on Nitrogen Fixation // Washington State University Press, Pullman, 1976. – P. 518–538.
56. Dobias J., Suvorova E.I., Bernier-Latmani R. Role of proteins in controlling selenium nanoparticle size // *Nanotechnology.* – 2011. – Vol. 22. – N. 19. – P. 195605.
57. Doran J.W., Alexander M. Microbial Formation of Volatile Selenium Compounds in Soil // *Soil. Sci. Soc. Am. J.* – 1977. – Vol. 41. – N. 1. – P. 70–73.

58. Dowdle P.R., Oremland R.S. Microbial oxidation of elemental selenium in soil slurries and bacterial cultures // *Environ. Sci. Technol.* – 1998. – Vol. 32. – N. 23. – P. 3749–3755.
59. Dungan R.S., Frankenberger Jr W.T. Factors affecting the volatilization of dimethylselenide by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 // *Soil Biol. Biochem.* – 2000. – Vol. 32. – N. 10. – P. 1353–1358.
60. Dungan R.S., Yates S.R., Frankenberger Jr W.T. Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment // *Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 5. – N. 4. – P. 287–295.
61. El-Bayoumy K., Sinha R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds // *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* – 2004. – Vol. 551. – P. 181–197.
62. Esaki N., Seraneeprakarn V., Tanaka H., Soda K. Purification and characterization of *Clostridium sticklandii* d-selenocystine α , β -lyase // *J. Bacteriol.* – 1988. – Vol. 170. – N. 2. – P. 751–756.
63. Estevam E.C., Griffin S., Nasim M.J., Denezhkin P., Schneider R., Lilischkis R., Dominguez-Alvarez E., Witek K., Latacz G., Keck C., Schäfer K.-H., Kieć-Kononowicz K., Handzlik J., Jacob C. Natural selenium particles from *Staphylococcus carnosus*: hazards or particles with particular promise? // *J. Hazard. Mater.* – 2017. – Vol. 324. – P. 22–30.
64. Eszenyi P., Sztrik A., Babka B., Prokisch J. Elemental, nano-sized (100–500 nm) selenium production by probiotic lactic acid bacteria // *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinform.* – 2011. – Vol. 1. – N. 2. – P. 148.
65. Eysel H.H., Sunder S. Homonuclear bonds in sulfur-selenium mixed crystals: a Raman spectroscopic study // *Inorg. Chem.* – 1979. – V. 18. – N. 9. – P. 2626–2627.
66. Fellowes J.W., Patrick R.A.D., Lloyd J.R., Charnock J.M., Coker V.S., Mosselmans J.F.W., Weng T-C., Pearce C.I. Ex situ formation of metal selenide

quantum dots using bacterially derived selenide precursors // *Nanotechnology*. – 2013. – Vol. 24. – N. 14. – P. 145603.

67. Fernandez-Martinez A., Charlet L. Selenium environmental cycling and bioavailability: a structural chemist point of view // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 8. – N. 1. – P. 81–110.

68. Fonknechten N., Chaussonnerie S., Tricot S., Lajus A., Andreesen J.R., Perchat N., Pelletier E., Gouyvenoux M., Barbe V., Salanoubat M., Le Paslier D., Weissenbach J., Cohen G.N., Kreimeyer A. *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence // *BMC Genomics*. – 2010. – Vol. 11. – N. 1 – P. 555.

69. Fordyce F.M. Selenium deficiency and toxicity in the environment // *Essentials of medical geology*. – Springer, Dordrecht, 2013. – P. 375–416.

70. Fujita M., Ike M., Nisbimoto S., Takahasbi K., Kasbiwa M. Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1 // *J. Ferment. Bioeng.* – 1997. – Vol. 83. – N. 6. – P. 517–522.

71. Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation // *AMB Expr.* – 2018. – Vol. 8. – N. 1. – P. 73.

72. Fukami J., Nogueira M.A., Araujo R.S., Hungria M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense* // *AMB Expr.* – 2016. – Vol. 6. – N. 1. – P. 3.

73. Gadd G.M. Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1993. – Vol. 11. – P. 297–316.

74. Ganther H.E. Enzymic synthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in mouse liver extracts // *Biochemistry*. – 1966. – Vol. 5. – N. 3. – P. 1089–1098.

75. Ganther H.E. Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid // *Biochemistry*. – 1968. – Vol. 7. – N. 8. – P. 2898–2905.

76. Garbisu C., Carlson D., Adamkiewicz M., Yee B.C., Wong J.H., Resto E., Leighton T., Buchanan B.B. Morphological and biochemical responses of

Bacillus subtilis to selenite stress // *Biofactors*. – 1999. – Vol. 10. – N. 4. – P. 311–319.

77. Garbisu C., Ishii T., Leighton T., Buchanan B.B. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium // *Chem. Geol.* – 1996. – Vol. 132. – N. 1-4. – P. 199–204.

78. Garcia G.E., Stadtman T.C. *Clostridium sticklandii* glycine reductase selenoprotein A gene: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 174. – P. 7080–7089.

79. Gladyshev V.N., Khangulov S.V., Stadtman T.C. Nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*: electron paramagnetic resonance studies show that selenium is coordinated with molybdenum in the catalytically active selenium-dependent enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 91. – N. 1. – P. 232–236.

80. Gonzalez-Gil G., Lens P.N.L., Saikaly P.E. Selenite reduction by anaerobic microbial aggregates: microbial community structure, and proteins associated to the produced selenium spheres // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 571.

81. Gristwood T., McNeil M.B., Clulow J.S., Salmond G.P., Fineran P.C. PigS and PigP regulate prodigiosin biosynthesis in *Serratia* via differential control of divergent operons, which include predicted transporters of sulfur-containing molecules // *J. Bacteriol.* – 2011. – Vol. 193. – N. 5. – P. 1076–1085.

82. Guliy O.I., Matora L.Y., Burygin G.L., Dykman L.A., Ostudin N.A., Bunin V.D., Ignatov V.V., Ignatov O.V. Electrophysical characteristics of *Azospirillum brasilense* Sp245 during interaction with antibodies to various cell surface epitopes // *Anal. Biochem.* – 2007. – Vol. 370. – N. 2. – P. 201–205.

83. Gursinsky T., Gröbe D., Schierhorn A., Jäger J., Andreesen J.R., Söhling B. Factors and selenocysteine insertion sequence requirements for the synthesis of selenoproteins from a gram-positive anaerobe in *Escherichia coli* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74. – N. 5. – P. 1385–1393.

84. Guymer D., Maillard J., Sargent F. A genetic analysis of in vivo selenate reduction by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2 and *Escherichia coli* K12 // Arch. Microbiol. – 2009. – Vol. 191. – N. 6. – P. 519–528.
85. Hamilton S.J. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain // Sci. Total. Environ. – 2004. – Vol. 326. – N. 1-3. – P. 1–31.
86. Hatfield D.L., Tsuji P.A., Carlson B.A., Gladyshev V.N. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development // Trends Biochem. Sci. – 2014. – 39. – P. 112–120.
87. Heider J., Bock A. Selenium metabolism in micro-organisms // Adv. Microb. Physiol. – 1993. – Vol.35. – N. 71. – P. 109.
88. Herbel M.J., Blum J.S., Oremland R.S., Borglin S.E. Reduction of elemental selenium to selenide: experiments with anoxic sediments and bacteria that respire Se-oxyanions // Geomicrobiol. J. – 2003. – Vol. 20. – P. 587–602.
89. Hoffman D.J. Role of selenium toxicity and oxidative stress in aquatic birds // Aquat. Toxicol. – 2002. – Vol. 57. – N. 1-2. – P. 11–26.
90. Hormann J.E., Del Rio R.M., Davis J.N., Stadtman T.C. Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1976. – Vol. 73. – P. 2659–2663.
91. Hormann K., Andreesen J.R. Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *Eubacterium acidaminophilum* via enzyme systems different from glycine reductase // Arch. Microbiol. – 1989. – Vol. 153. – N. 1. – P. 50–59.
92. Hsieh H.S., Ganther H.E. Biosynthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in rat liver and kidney cell-free systems // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. – 1977. – Vol. 497. – N. 1. – P. 205–217.
93. Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R., Greenberg B.M. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils // Environ. Pollut. – 2004. – Vol. 130. – N. 3. – P. 465–476.

94. Huber R., Sacher M., Vollmann A., Huber H., Rose D. Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2000. – Vol. 23. – N. 3. – P. 305–314.
95. Hudman J.F., Glenn A.R. Selenite uptake and incorporation by *Selenomonas ruminatum* // *Arch. Microbiol.* – 1984. – Vol. 140. – №. 2–3. – C. 252–256.
96. Hungria M., Campo R.J., Souza E.M., Pedrosa F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil // *Plant. Soil.* – 2010. – Vol. 331. – N. 1-2. – P. 413–425.
97. Hunter W.J., Kuykendall L.D. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Rhizobium* sp. strain B1 // *Curr. Microbiol.* – 2007. – Vol. 55. – N. 4. – P. 344–349.
98. Hunter W.J., Kuykendall L.D., Manter D.K. *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: a selenite-reducing α -Proteobacteria isolated from a bioreactor // *Curr. Microbiol.* – 2007. – Vol. 55. – N. 5. – P. 455–460.
99. Hunter W.J., Manter D.K. Bio-reduction of selenite to elemental red selenium by *Tetrathibacter kashmirensis* // *Curr. Microbiol.* – 2008. – Vol. 57. – N. 1. – P. 83–88.
100. Hunter W.J., Manter D.K. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Pseudomonas* sp. strain CA5 // *Curr. Microbiol.* – 2009. – Vol. 58. – N. 5. – P. 493–498.
101. Jain R., Jordan N., Weiss S., Foerstendorf H., Heim K., Kacker R., Hübner R., Kramer H., van Hullebusch E.D., Farges F., Lens P.N.L. Extracellular polymeric substances govern the surface charge of biogenic elemental selenium nanoparticles // *Environ. Sci. Technol.* – 2015. – Vol. 49. – N. 3. – P. 1713–1720.
102. Jia X., Li N., Chen J. A subchronic toxicity study of elemental nano-Se in Sprague-Dawley rats // *Life Sci.* – 2005. – Vol. 76. – N. 17. – P. 1989–2003.
103. Kabisch U.C., Grantzdorffer A., Schierhorn A., Rucknagel K.P., Andreesen J.R., Pich A. Identification of d-proline reductase from *Clostridium*

sticklandii as a selenoenzyme and indications for a catalytically active pyruvoyl group derived from a cysteine residue by cleavage of a proprotein // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274. – N. 13. – P. 8445–8454.

104. Kagami T., Narita T., Kuroda M., Notaguchi E., Yamashita M., Sei K., Soda S., Ike M. Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I // Water Res. – 2013. – Vol. 47. – N. 3. – P. 1361–1368.

105. Kamnev A.A. FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling // Spectrosc. Int. J. – 2008. – Vol. 22. – N. 2-3. – P. 83–95.

106. Kamnev A.A., Sadovnikova J.N., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Antonyuk L.P. Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin: a diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopic study // Microb. Ecol. – 2008. – Vol. 56. – N. 4. – P. 615–624.

107. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P., Tarantilis P.A., Kulikov L.A., Perfiliev Yu.D., Polissiou M.G., Gardiner P.H.E. Instrumental analysis of bacterial cells using vibrational and emission Mössbauer spectroscopic techniques // Anal. Chim. Acta. – 2006. – Vol. 573. – P. 445–452.

108. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Tarantilis P.A., Gardiner P.H.E., Polissiou M.G. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: the effects of copper (II) // Appl. Soil Ecol. – 2012. – Vol. 61. – P. 213–216.

109. Kanzok S.M., Fechner A., Bauer H., Ulschmid J.K., Müller H.M., Botella-Munoz J., Schneuwly S., Schirmer R., Becker K. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster* // Science. – 2001. – Vol. 291. – P. 643–646.

110. Kaur G., Iqbal M., Bakshi M.S. Biomineralization of fine selenium crystalline rods and amorphous spheres // J. Phys. Chem. C. – 2009. – Vol. 113. – N. 31. – P. 13670–13676.

111. Kessi J. Enzymic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in the purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter capsulatus* // *Microbiology*. – 2006. – Vol. 152. – N. 3. – P. 731–743.

112. Kessi J., Hanselmann K.W. Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – N. 49. – P. 50662–50669.

113. Kessi J., Ramuz M., Wehrli E., Spycher M., Bachofen R. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65. – N. 11. – P. 4734–4740.

114. Kim H.Y., Zhang Y., Lee B.C., Kim J.R., Gladyshev V.N. The selenoproteome of *Clostridium* sp. OhILAs: characterization of anaerobic bacterial selenoprotein methionine sulfoxide reductase A // *Proteins*. – 2009. – Vol. 74. – N. 4. – P. 1008–1017.

115. Kim M.J., Lee B.C., Hwang K.Y., Gladyshev V.N., Kim H.Y. Selenium utilization in thioredoxin and catalytic advantage provided by selenocysteine // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Vol. 461. – N. 4. – P. 648–652.

116. Konnova O.N., Boiko A.S., Burygin G.L., Fedonenko Y.P., Matora L.Y., Konnova S.A., Ignatov V.V. Chemical and serological studies of liposaccharides of bacteria of the genus *Azospirillum* // *Microbiology*. – 2008. – Vol. 77. – N. 3. – P. 305–312.

117. Kora A.J., Rastogi L. Bacteriogenic synthesis of selenium nanoparticles by *Escherichia coli* ATCC 35218 and its structural characterisation // *IET Nanobiotechnol.* – 2016. – Vol. 11. – N. 2. – P. 179–184.

118. Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O., Guigo R., Gladyshev V.N. Characterization of Mammalian Selenoproteomes // *Science*. – 2003. – Vol. 300. – P. 1439–1443.

119. Kryukov G.V., Gladyshev V.N. The prokaryotic selenoproteome // *EMBO Rep.* – 2004. – Vol. 5. – N. 5. – P. 538–543.

120. Kuroda M., Yamashita M., Miwa E., Imao K., Fujimoto N., Ono H., Nagano K., Sei K., Ike M. Molecular cloning and characterization of the *srdBCA* operon, encoding the respiratory selenate reductase complex, from the selenate-reducing bacterium *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 // J. Bacteriol. – 2011. – Vol. 193. – N. 9. – P. 2141–2148.

121. Lacourciere G.M., Levine R.L., Stadtman T.C. Direct detection of potential selenium delivery proteins by using an *Escherichia coli* strain unable to incorporate selenium from selenite into proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2002. – Vol. 99. – N. 14. – P. 9150–9153.

122. Lacourciere G.M., Stadtman T.C. Catalytic properties of selenophosphate synthetases: comparison of the selenocysteine-containing enzyme from *Haemophilus influenzae* with the corresponding cysteine-containing enzyme from *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1999. – Vol. 96. – P. 44–48.

123. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – N. 5259. – P. 680–685.

124. Lampis S., Zonaro E., Bertolini C., Bernardi P., Butler C.S., Vallini G. Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycoides* SeITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions // Microb. Cell Fact. – 2014. – Vol. 13. – N. 1. – P. 35–49.

125. Lampis S., Zonaro E., Bertolini C., Cecconi D., Monti F., Micaroni M., Turner R.J., Butler C.S., Vallini G. Selenite biotransformation and detoxification by *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02: novel clues on the route to bacterial biogenesis of selenium nanoparticles // J. Hazard. Mater. – 2017. – Vol. 324. – P. 3–14.

126. Laverman A.M., Blum J.S., Schaefer J.K., Phillips E., Lovley D.R., Oremland R.S. Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – N. 10. – P. 3556–3561.

127. Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A., Grabovich M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a

diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring // *Int. J. Syst. Evol. Microb.* – 2010. – Vol. 60. – N. 12. – P. 2832–2837.

128. Lemly A.D. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example // *Aquat. Toxicol.* – 2002. – Vol. 57. – N. 1-2. – P. 39–49.

129. Lenz M., Lens P.N.L. The essential toxin: the changing perception of selenium in environmental sciences // *Sci. Total. Environ.* – 2009. – Vol. 407. – P. 3620–3633.

130. Li B., Li D., Jing W., Fan J., Dahms H.U., Lee S.C., Wang L. Biogenic selenium and its hepatoprotective activity // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – N. 1. – P. 15627.

131. Li D.B., Cheng Y.Y., Wu C., Li W.W., Li N., Yang Z.C., Tong Z.H., Yu H.Q. Selenite reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 is mediated by fumarate reductase in periplasm // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol. 4. – N. 3735.

132. Lin J., Peng T., Jiang L., Ni J.Z., Liu Q., Chen L., Zhang Y. Comparative genomics reveals new candidate genes involved in selenium metabolism in prokaryotes // *Genome Biol. Evol.* – 2015. – Vol. 7. – N. 3. – P. 664–676.

133. Lin S.Y., Shen F.T., Young L.S., Zhu Z.L., Chen W.M., Young C.C. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2012. – Vol. 62. – N. 5. – P. 1185–1190.

134. Lin S.-Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.-M., Lai W.-A., Shen F.-T., Rekha P.D., Yassin A.F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – Vol. 59. – N. 4. – P. 761–765.

135. Losi M.E., Frankenberger W.T. Microbial oxidation and solubilization of precipitated elemental selenium in soil // *J. Environ. Qual.* – 1998. – Vol. 27. – N. 4. – P. 836–843.

136. Losi M.E., Frankenberger W.T. Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: isolation and growth of the bacterium and its

expulsion of selenium particles // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. – N. 8. – P. 3079–3084.

137. Lowe E.C., Bydder S., Hartshorne R.S., Tape H.L., Dridge E.J., Debieux C.M., Paszkiewicz K., Singleton I., Lewis R.J., Santini J.M., Richardson D.J., Butler C.S. Quinol-cytochrome c oxidoreductase and cytochrome c4 mediate electron transfer during selenate respiration in *Thauera selenatis*. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – N. 24. – P. 18433–18442.

138. Lucovsky G., Mooradian A., Taylor W., Wright G.B., Keezer R.C. Identification of the fundamental vibrational modes of trigonal, α -monoclinic and amorphous selenium // *Solid State Commun.* – 1967. – Vol. 5. – N. 2. – P. 113–117.

139. Lucy M., Reed E., Glick B.R. Applications of free-living plant growth-promoting rhizobacteria // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2004. – Vol. 86. – N. 1. – P. 1–25.

140. Luoma S.N., Johns C., Fisher N.S., Steinberg N.A., Oremland R.S., Reinfelder J.R. Determination of selenium bioavailability to a bivalve from particulate and solute pathways // *Environ. Sci. Technol.* – 1992. – Vol. 26. – N. 3. – P. 485–491.

141. Macy J.M., Michel T.A., Kirsch D.G. Selenate reduction by *Pseudomonas* species: a new mode of anaerobic respiration // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1989. – Vol. 61. – N. 1-2. – P. 195–198.

142. Macy J.M., Rech S., Auling G., Dorsch M., Stackebrandt E., Sly L.I. *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the beta subclass of Proteobacteria with a novel type of anaerobic respiration // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 43. – N. 1. – P. 135–142.

143. Mahler H.C., Huber F., Kishore R.S.K., Reindl J., Rückert P., Müller R. Adsorption behavior of a surfactant and a monoclonal antibody to sterilizing-grade filters // *J. Pharm. Sci.* – 2010. – T. 99. – №. 6. – C. 2620–2627.

144. Marsili E., Baron D.B., Shikhare I.D., Coursolle D., Gralnick J.A., Bond D.R. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2008. – Vol. 105. – N. 10. – P. 3968–3973.

145. Mavandadnejad F., Yazdi M.H., Hassanzadeh S.M., Mahdavi M., Faramarzi M.A., Pazoki-Toroudi H., Shahverdi A.R. Biosynthesis of SeNPs by *Mycobacterium bovis* and their enhancing effect on the immune response against HBs antigens: an in vivo study // IET Nanobiotechnol. – 2017. – Vol. 12. – N. 1. – P. 57–63.

146. McCarthy S., Chasteen T., Marshall M., Fall R., Bachofen R. Phototrophic bacteria produce volatile, methylated sulfur and selenium compounds // FEMS Microbiol. Lett. – 1993. – Vol. 112. – N. 1. – P. 93–97.

147. Medina Cruz D., Mi G., Webster T.J. Synthesis and characterization of biogenic selenium nanoparticles with antimicrobial properties made by *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2018. – Vol. 106. – N. 5. – P. 1400–1412.

148. Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – Vol. 57. – N. 12. – P. 2805–2809.

149. Meyer M., Granderath K., Andreesen J.R. Purification and characterization of protein PB of betaine reductase and its relationship to the corresponding proteins glycine reductase and sarcosine reductase from *Eubacterium acidaminophilum* // Eur. J. Biochem. – 1995. – Vol. 234. – N. 1. – P. 184–191.

150. Mihara H., Kurihara T., Yoshimura T., Esaki N. Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between l-cysteine desulfurase and l-selenocysteine lyase reactions // J. Biochem. – 2000. – Vol. 127. – N. 4. – P. 559–567.

151. Minaev V.S., Timoshenkov S.P., Kalugin V.V. Structural and phase transformations in condensed selenium // *J. Optoelectron. Adv. Mater.* – 2005. – Vol. 7. – N. 4. – P. 1717–1741.

152. Mishra R.R., Prajapati S., Das J., Dangar T.K., Das N., Thatoi H. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product // *Chemosphere.* – 2011. – Vol. 84. – N. 9. – P. 1231–1237.

153. Mollania N., Tayebee R., Narenji-Sani F. An environmentally benign method for the biosynthesis of stable selenium nanoparticles // *Res. Chem. Intermed.* – 2016. – Vol. 42. – N. 5. – P. 4253–4271.

154. Mozier N.M., McConnell K.P., Hoffman J.L. S-adenosyl-L-methionine: thioether S-methyltransferase, a new enzyme in sulfur and selenium metabolism // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – N. 10. – P. 4527–4531.

155. Muller S., Heider J., Bock A. The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli* // *Arch. Microbiol.* – 1997. – Vol. 168. – N. 5. – P. 421–427.

156. Muratova A.Y., Bondarenkova A.D., Panchenko L.V., Turkovskaya O.V. Use of integrated phytoremediation for cleaning-up of oil-sludge-contaminated soil // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2010. – Vol. 46. – N. 8. – P. 789–794.

157. Muyzer G., Stams A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – Vol. 6. – N. 6. – P. 441.

158. Myers T. Remediation scenarios for selenium contamination, Blackfoot watershed, southeast Idaho, USA // *Hydrogeol. J.* – 2013. – Vol. 104. – P. 309–339.

159. Nakagawa T., Lino T., Suzuki K.I., Harayama S. *Ferrimonas futtsuensis* sp. nov. and *Ferrimonas kyonanensis* sp. nov. selenate-reducing bacteria belonging to the *Gammaproteobacteria* isolated from Tokyo Bay // *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 56. – N. 11. – P. 2639–2645.

160. Nancharaiyah Y.V., Lens P.N.L. Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2015. – Vol. 79. – N. 1. – P. 61–80.

161. Narasingarao P., Häggblom M.M. *Pelobacter seleniigenes* sp. nov. a selenate-respiring bacterium // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57. – N. 9. – P. 1937–1942.

162. Naumann D. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research // *Appl. Spectrosc. Rev.* – 2001. – Vol. 36. – N. 2-3. – P. 239–298.

163. Naumann D. Infrared spectroscopy in microbiology // *Encyclopedia of Analytical Chemistry.* – Wiley, Chichester, 2000. – P. 102–131.

164. Newton G.L., Fahey R.C. Glutathione in prokaryotes. In glutathione: metabolism and physiological functions // *CRC Press, Boca Raton, 1989.* – P. 69–77.

165. Nicholas D.J.D., Nason A. Determination of nitrate and nitrite // *Methods in Enzymology.* – Academic Press, New York, 1957. – P. 981–984.

166. Ohlendorf H.M. Bioaccumulation and effects of selenium in wildlife // *Selenium in agriculture and the environment.* – Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, 1989. – P. 133–177.

167. Oremland R.S., Herbel M.J., Blum J.S., Langley S., Beveridge T.J., Ajayan P.M., Sutto T., Ellis A.V., Curran S. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70. – P. 52–60.

168. Oremland R.S., Hollibaugh J.T., Maest A.S., Presser T.S., Miller L.G., Culbertson C.W. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel sulfate-independent respiration // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1989. – Vol. 55. – N. 9. – P. 2333–2343.

169. Oremland R.S., Switzer Blum J., Culberston C.W., Visscher P.T., Miller L.G., Dowdle P., Strohmaier F.E. Isolation, growth and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – Vol. 60. – N. 8. – P. 3011–3019.

170. Painter E.P. The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem // Chem. Rev. – 1941. – Vol. 28. – N. 2. – P. 179–213.

171. Pearce C.I., Coker V.S., Charnock J.M., Patrick R.A.D., Mosselmanns J.F.W., Law N., Beveridge T.J., Lloyd J.R. Microbial manufacture of chalcogenide- based nanoparticles via the reduction of selenite using *Veillonella atypica*: an in situ EXAFS study // Nanotechnology. – 2008. – Vol. 19. – N. 15. – P. 155603–155616.

172. Pearce C.I., Patrick R.A.D., Law N., Charnock J.M., Coker V.S., Fellowes J.W., Oremland R.S., Lloyd J.R. Investigating different mechanisms for biogenic selenite transformations: *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis* and *Veillonella atypica* // Environ. Technol. – 2009. – Vol. 30. – N. 12. – P. 1313–1326.

173. Peng T., Lin J., Xu Y.Z., Zhang Y. Comparative genomics reveals new evolutionary and ecological patterns of selenium utilization in bacteria // ISME J. – 2016. – Vol. 10. – N. 8. – P. 2048–2059.

174. Pereg L., de-Bashan L.E., Bashan Y. (2016) Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. Plant Soil – 2016. – Vol. 399. – N. 1-2. – P. 389–414.

175. Pinsent J. Need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the *Escherichia coli*-*Aerobacteraerogenes* group of bacteria // Biochem. J. – 1954. – Vol. 57. – P. 10–16.

176. Presser T.S. The Kesterson effect // Environ. Manag. – 1998. – Vol. 18. – P. 437–454.

177. Presser T.S., Ohlendorf H.M. Biogeochemical cycling of selenium in the San Joaquin Valley, California, USA // Environ. Manag. – 1987. – Vol. 11. – N. 6. – P. 805–821.

178. Ramya S., Shanmugasundaram T., Balagurunathan R. Biomedical potential of actinobacterially synthesized selenium nanoparticles with special

reference to anti-biofilm, anti-oxidant, wound healing, cytotoxic and anti-viral activities // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 32. – P. 30–39.

179. Ranjard L., Prigent-Combaret C., Favre-Bonté S., Monnez C., Nazaret S., Cournoyer B. Characterization of a novel selenium methyltransferase from freshwater bacteria showing strong similarities with the calicheamicin methyltransferase // *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression.* – 2004. – Vol. 1679. – N. 1. – P. 80–85.

180. Ranjard L., Prigent-Combaret C., Nazaret S., Cournoyer B. Methylation of inorganic and organic selenium by the bacterial thiopurine methyltransferase // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184. – N. 11. – P. 3146–3149.

181. Rauschenbach I., Narasingarao P., Haggblom M.M. *Desulfurispirillum indicum* sp. nov. a selenate- and selenite-respiring bacterium isolated from an estuarine canal // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2011. – Vol. 61. – N. 3. – P. 654–658.

182. Rech S.A., Macy J.M. The terminal reductases for selenate and nitrate respiration in *Thauera selenatis* are two distinct enzymes // *J. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 174. – N. 22. – P. 7316–7320.

183. Reich H.J.; Hondal R.J. Why nature chose selenium // *ACS Chem. Biol.* – 2016. – Vol. 11. – P. 821–841.

184. Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans S., De Ley J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Organism Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) // *Int. J. Sys. Bacteriol.* – 1987. – Vol. 37. – N. 1. – P. 43–51.

185. Ridley H., Watts C.A., Richardson D.J., Butler C.S. Resolution of distinct membrane-bound enzymes from *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 that are responsible for selective reduction of nitrate and selenate oxyanions // *Appl Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. – N. 8. – P. 5173–5180.

186. Rother M., Wilting R., Commans S., Böck A. Identification and characterisation of the selenocysteine-specific translation factor SelB from the

archaeon *Methanococcus jannaschii* // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 299. – N. 2. – C. 351–358.

187. Roux M., Sarret G., Pignot-Paintrand I., Fontecave M., Coves J. Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34 // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67. – N. 2. – P. 769–773.

188. Sabaty M., Avazeri C., Pignol D., Vermeglio A. Characterization of the reduction of selenate and tellurite by nitrate reductases // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67. – N. 11. – P. 5122–5126.

189. Sarathchandra S.U., Watkinson J.H. Oxidation of elemental selenium to selenite by *Bacillus megaterium* // Science. – 1981. – Vol. 211. – N. 4482. – P. 600–601.

190. Sarret G., Avoscan L., Carrière M., Collins R., Geoffroy N., Carrot F., Covès J., Gouget B. Chemical forms of selenium in the metal-resistant bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 exposed to selenite and selenate // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – N. 5. – P. 2331–2337.

191. Sawers R.G, Blokesch M., Böck A. Anaerobic formate and hydrogen metabolism // EcoSal Plus. – 2004. – Vol. 1. – N. 1.

192. Schlekot C.E., Dowdle P.R., Lee B.G., Luoma S.N., Oremland R.S. Bioavailability of particle-associated selenium on the bivalve *Potamocorbula amurensis* // Environ. Sci. Technol. – 2000. – Vol. 34. – N. 21. – P. 4504–4510.

193. Schloter M., Hartmann A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies // Symbiosis, Philadelphia. – 1998. – P. 159–179.

194. Schröder T., Rienhöfer A., Andreesen J.R. Selenium-containing xanthine dehydrogenase from *Eubacterium barkeri* // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 264. – N. 3. – P. 862–871.

195. Schwarz K., Foltz C.M. Selenium as an integral part of factor against dietary liver degeneration // J. Am. Chem. Soc. – 1957. – Vol. 79. – P. 3292–3293.

196. Self W.T., Stadtman T.C. Selenium-dependent metabolism of purines: a selenium-dependent purine hydroxylase and xanthine dehydrogenase were purified from *Clostridium purinolyticum* and characterized // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2000. – Vol. 97. – N. 13. – P. 7208–7213.

197. Self W.T., Wolfe M.D., Stadtman T.C. Cofactor determination and spectroscopic characterization of the selenium-dependent purine hydroxylase from *Clostridium purinolyticum* // Biochemistry. – 2003. – Vol. 42. – N. 38. – P. 11382–11390.

198. Shakibaie M., Forootanfar H., Golkari Y., Mohammadi-Khorsand T., Shakibaie M.R. Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis* // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2015. – Vol. 29. – P. 235–241.

199. Shelud'ko A.V., Varshalomidze O.E., Petrova L.P., Katsy E.I. Folia Effect of genomic rearrangement on heavy metal tolerance in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 // Folia Microbiol. – 2012. – Vol. 57. – N. 1. – P. 5–10.

200. Shi L., Richardson D.J., Wang Z., Kerisit S.N., Rosso K.M., Zachara J.M., Fredrickson J.K. The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer // Environ. Microbiol. Rep. – 2009. – Vol. 1. – N. 4. – P. 220–227.

201. Shi Y., Li X. Biomedical applications and adverse health effects of nanomaterials // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2012. – Vol. 12. – N. 11. – P. 8231–8240.

202. Shirsat S., Kadam A., Naushad Mu., Mane R.S. Selenium nanostructures: microbial synthesis and applications // RSC Adv. – 2015. – Vol. 5. – N. 112. – P. 92799–92811.

203. Shrift A. A selenium cycle in nature? // Nature. – 1964. – Vol. 201. – N. 4926. – P. 1304–1305.

204. Sohling B., Parther T., Rucknagel K.P., Wagner M.A., Andreesen J.R. A selenocysteine-containing peroxiredoxin from the strictly anaerobic organism *Eubacterium acidaminophilum* // Biol. Chem. – 2001. – Vol. 382. – N. 6. – P. 979–986.

205. Sonkusre P., Nanduri R., Gupta P., Cameotra S.S. Improved extraction of intracellular biogenic selenium nanoparticles and their specificity for cancer chemoprevention // J. Nanomed. Nanotechnol. – 2014. – Vol. 5. – N. 2. – P. 1.

206. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera* // Powder Tech. – 2013. – Vol. 244. – P. 26–29.

207. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Green synthesis and structural characterization of selenium nanoparticles and assessment of their antimicrobial property // Bioproc. Biosyst. Eng. – 2015. – Vol. 38. – N. 9. – P. 1723–1730.

208. Srivastava P., Kowshik M. Anti-neoplastic selenium nanoparticles from *Idiomarina* sp. PR58-8 // Enzyme Microb. Technol. – 2016. – Vol. 95. – P. 192–200.

209. Stadtman T.C. Selenium biochemistry: Proteins containing selenium are essential components of certain bacterial and mammalian enzyme systems // Science. – 1974. – Vol. 183. – N. 4128. – P. 915–922.

210. Staicu L.C., Barton L.L. Bacterial metabolism of selenium – for survival or profit / Ed. by E. van Hullebusch. – Bioremediation of Selenium Contaminated Wastewater. – Springer, Cham, 2017. – P. 1–31.

211. Stolz J., Basu P., Oremland R. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium // Int. Microbiol. – 2002. – Vol. 5. – P. 201–207.

212. Stolz J.F., Basu P., Santini J.M., Oremland R.S. Arsenic and selenium in microbial metabolism // Annu. Rev. Microbiol. – 2006. – Vol. 60. – P. 107–130.

213. Stolz J.F., Oremland R.S. Bacterial respiration of arsenic and selenium // FEMS Microbiol. Rev. – 1999. – Vol. 23. – P. 615–627.

214. Sura-de Jong M., Reynolds R.J.B., Richterova K., Musilova L., Staicu L.C., Chocholata I., Cappa J.J., Taghavi S., van der Lelie D., Frantik T., Dolinova

I., Strejcek M., Cochran A.T., Lovecka P., Pilon-Smits E.A.H. Selenium hyperaccumulators harbor a diverse endophytic bacterial community characterized by high selenium resistance and plant growth promoting properties // *Front. Plant Sci.* – 2015. – Vol. 6. – Article 113. – <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00113>.

215. Suzuki M., Endo M., Shinohara F., Echigo S., Rikiishi H. Differential apoptotic response of human cancer cells to organoselenium compounds // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 66. – P. 475–484.

216. Tam K., Ho C.T., Lee J.H., Lai M., Chang C.H., Rheem Y., Chen W., Hur H.G., Myung N.V. Growth mechanism of amorphous selenium nanoparticles synthesized by *Shewanella* sp. HN-41 // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2010. – Vol. 74. – N. 4. – P. 696–700.

217. Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. // *Can. J. Microbiol.* – 1978. – Vol. 24. – N. 8. – P. 967–980.

218. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). – URL: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/> (дата обращения: 05.09.2019).

219. Tomei F.A. Barton L.L., Lemanski C.L., Zocco T.G., Fink N.H., Sillerud, L.O. Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans* // *J. Ind. Microbiol.* – 1995. – Vol. 14. – N. 3-4. – P. 329–336.

220. Tugarova A.V., Kamnev A.A. Proteins in microbial synthesis of selenium nanoparticles // *Talanta.* – 2017. – Vol. 174. – P. 539–547.

221. Tugarova A.V., Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Burov A.M., Nikitina V.E., Kamnev A.A. Reduction of selenite by *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles // *Microb. Ecol.* – 2014. – Vol. 68. – N. 3. – P. 495–503.

222. Turner R.J., Weiner J.H., Taylor D.E. Selenium metabolism in *Escherichia coli* // *Biometals.* – 1998. – Vol. 11. – N. 3. – P. 223–227.

223. Van Overschelde O., Guisbiers G., Photo-fragmentation of selenium powder by excimer laser ablation in liquids // *Opt. Laser Technol.* – 2015. – Vol. 73. – P. 156–161.

224. Vogel M., Fischer S., Maffert A., Hübner R., Scheinost A., Franzen C., Steudtner R. Biotransformation and detoxification of selenite by microbial biogenesis of selenium-sulfur nanoparticles // *J. Hazard. Mater.* – 2018. – Vol. 344. – P. 749–757.

225. von Canstein H., Ogawa J., Shimizu S., Lloyd J.R. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74. – N. 3. – P. 615–623.

226. von Wintzingerode F., Gobel U.B., Siddiqui R.A., Rosick U., Schumann P., Fruhling A., Rohde M., Pukall R., Stackebrandt E. *Salana multivorans* gen. nov. sp. nov., a novel actinobacterium isolated from an anaerobic bioreactor and capable of selenate reduction // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 51. – N. 5. – P. 1653–1661.

227. Wadhvani S.A., Shedbalkar U.U., Singh R., Chopade B.A. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 100. – N. 6. – P. 2555–2566.

228. Wagner M., Sonntag D., Grimm R., Pich A., Eckerskorn C., Sohling B., Andreesen J.R. Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – Vol. 260. – N. 1. – P. 38–49.

229. Wang H.L., Zhang J.S., Yu H.Q. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42. – P. 1524–1533.

230. Wang T., Yang L., Zhang B., Liu J. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor // *Colloids Surf. B.* – 2010. – Vol. 80. – N. 1. – P. 94–102.

231. Wang Y., Shu X., Zhou Q., Fan T., Wang T., Chen X., Li M., Ma Y., Ni J., Hou J., Zhao W., Li R., Huang S., Wu L. Selenite Reduction and the Biogenesis of Selenium Nanoparticles by *Alcaligenes faecalis* Se03 Isolated from the Gut of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19. – N. 9. – P. 2799.

232. Watts C.A., Ridley H., Condie K.L., Leaver J.T., Richardson D.J., Butler C.S. Selenate reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 is catalysed by a molybdenum-dependent membrane-bound enzyme that is distinct from the membrane-bound nitrate reductase // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – Vol. 228. – N. 2. – P. 273–279.

233. Williams K.H., Wilkins M.J., Guessan A.L., Arey B., Dodova E., Dohnalkova A., Holmes D., Lovley D.R., Long P.E. Field evidence of selenium bioreduction in a uranium-contaminated aquifer // Environ. Microbiol. Rep. – 2013. – Vol. 5. – P. 444–452.

234. Winkel L.H.E., Johnson C.A., Lenz M., Grundl T., Leupin O.X., Amini M., Charlet L. Environmental selenium research: from microscopic processes to global understanding // Environ. Sci. Technol. – 2011. – Vol. 46. – P. 571–579.

235. Xia X., Zhou Z., Wu S., Wang D., Zheng S., Wang, G. (2018). Adsorption removal of multiple dyes using biogenic selenium nanoparticles from an *Escherichia coli* strain overexpressed selenite reductase CsrF // Nanomaterials. – 2018. – Vol. 8. – N. 4. – P. 234.

236. Yadav V., Sharma N., Prakash R., Raina K.K., Bharadwaj L.M., Prakash N.T. Generation of selenium containing nano-structures by soil bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* // Biotech. – 2008. – Vol. 7. – N. 2. – P. 299–304.

237. Yamada A., Miyashita M., Inoue K., Matsunaga T. Extracellular reduction of selenite by a novel marine photosynthetic bacterium // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 48. – N. 3. – P. 367–372.

238. Yang S.I., George G.N., Lawrence J.R., Kaminskyj S.G.W., Dynes J.J., Lai B., Pickering I.J. Multispecies biofilms transform selenium oxyanions into elemental selenium particles: studies using combined synchrotron X-ray

fluorescence imaging and scanning transmission X-ray microscopy // *Environ. Sci. Technol.* – 2016. – Vol. 50. – N. 19. – P. 10343–10350.

239. Yazdi M.H., Mahdavi M., Setayesh N., Esfandyar M., Shahverdi A.R. Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer // *DARU J. Pharm. Sci.* – 2013. – Vol. 21. – N. 1. – P. 33.

240. Youssef G.A., El-Aassar S.A., Berekaa M., El-Shaer M., Stolz J. Arsenate and selenite reduction by some facultative bacteria in the Nile Delta // *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* – 2009. – Vol. 5. – N. 6. – P. 847–855.

241. Zahir A.Z., Zhang Y., Frankenberger W.T.Jr. Fate of selenate metabolized by *Enterobacter taylorae* isolated from rice straw // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – Vol. 51. – N. 12. – P. 3609–3613.

242. Zannoni D., Borsetti F., Harrison J.J., Turner R.J. The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te // *Adv. Microb. Physiol.* – 2007. – Vol. 53. – P. 1–52.

243. Zawadzka A.M., Crawford R.L., Paszczyński A.J. Pyridine-2, 6-bis (thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas stutzeri* KC reduces and precipitates selenium and tellurium oxyanions // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. – N. 5. – P. 3119–3129.

244. Zhang J., Wang Y., Shao Z., Li J., Zan S., Zhou S., Yang R. Two selenium tolerant *Lysinibacillus* sp. strains are capable of reducing selenite to elemental Se efficiently under aerobic conditions // *J. Environ. Sci.* – 2019. – Vol. 77. – P. 238–249.

245. Zhang J.S., Gao X.Y., Zhang L.D., Bao Y.P. Biological effects of a nano red elemental selenium // *Biofactors.* – 2001. – Vol. 15. – N. 1. – P. 27–38.

246. Zhang W., Chen Z., Liu H., Zhang L., Gao P., Li D. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles by *Pseudomonas alcaliphila* // *Colloids Surf. B.* – 2011. – Vol. 88. – N. 1. – P. 196–201.

247. Zhang Y., Okeke B.C., Frankenberger W.T. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium utilizing molasses as a carbon source // *Bioresour. Technol.* – 2008. – Vol. 99. – N. 5. – P. 1267–1273.

248. Zhang Y., Romero H., Salinas G., Gladyshev V.N. Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: a balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues // *Genome Biol.* – 2006. – Vol. 7. – N. 10. – P. R94.

249. Zhang Y., Siddique T., Wang J., Frankenberger W.T.Jr. Selenate reduction in river water by *Citrobacter freundii* isolated from a selenium-contaminated sediment // *J. Agric. Food. Chem.* – 2004. – Vol. 52. – N. 6. – P. 1594–1600.

250. Zhong L., Holmgren A. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – N. 24. – P. 18121–18128.

251. Zhou X., Wang Y., Gu Q., Li W. Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) // *Aquaculture.* – 2009. – Vol. 291. – P. 78–81.

252. Zolotarev A.S., Unnikrishnan M., Shmukler B.E., Clark J.S., Vanderpe D.H., Grigorieff N., Rubin E.J., Alper S.L. Increased sulfate uptake by *E. coli* overexpressing the SLC26-related SulP protein Rv1739c from *Mycobacterium tuberculosis* // *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* – 2008. – Vol. 149. – N. 3. – P. 255–266.

253. Zonaro E., Lampis S., Turner R.J., Qazi S.J.S., Vallini G. Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – Article No. 584. – URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00584>.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ 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 thiophilum* / A.V. Tugarova, **P.V. Mamchenkova**, Yu.A. Dyatlova, A.A. Kamnev // Colloquium Spectroscopicum Internationale XL, Pisa, Italy, 11th–16th 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 Сарат. ун-та, 2013. – Вып. 11 – С. 62–66.