

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

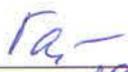
Кафедра биохимии и биофизики
УНЦ физико-химической биологии
СГУ и ИБФРМ РАН

**ВОССТАНОВЛЕНИЕ СЕЛЕНИТ-ИОНОВ БАКТЕРИЯМИ ВИДА
*AZOSPIRILLUM THIOPHILLUM***

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Магистранта 2 курса 241 группы
направления подготовки 06.04.01 - Биология
биологического факультета
Владимировой Анастасии Андреевны

Научный руководитель:
к.б.н., доцент



(подпись, дата)
19.06.2018

А.А. Галицкая

Научный консультант:
к.б.н., с.н.с.
ЛБ ИБФРМ РАН



(подпись, дата)

А.В. Тугарова

Зав. кафедрой
биохимии и биофизики
д.б.н., профессор



(подпись, дата)
19.06.2018

С.А. Коннова

Саратов, 2018

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Селен относится к важным микроэлементам и является незаменимым компонентом всех живых систем, но несмотря на целый ряд положительных свойств, в высоких концентрациях он токсичен. Большинство токсичных форм представлены оксоанионами селена в степенях окисления +4 и +6, а именно селенатами и селенитами. Данные процессы сопровождаются синтезом наночастиц селена. В последние годы изучению бактериальной трансформации селенитов и селенатов до элементарного селена посвящено множество работ. Данные процессы относятся к «зеленой химии», то есть особому инновационному направлению химии, предполагающему минимизацию вреда для окружающей среды в процессе синтеза различных соединений.

Цель работы. Изучение влияния селенита натрия на бактерии вида *A. thiophilum*. Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить токсичные концентрации Na_2SeO_3 для бактерий вида *A. thiophilum*.
2. Выявить способность к восстановлению Na_2SeO_3 и синтезу наночастиц селена бактериями вида *A. thiophilum*.
3. Определить средний размер и дзета-потенциал наночастиц селена, синтезированных бактериями *A. thiophilum* методами динамического рассеивания света и просвечивающей электронной микроскопии.
4. Провести исследование биоорганической составляющей наночастиц селена, синтезированных *A. thiophilum* методом ИК-фурье-спектроскопии.
5. Определить аллотропную модификацию элементарного селена в наночастицах методом спектроскопии комбинационного рассеяния.

Научная новизна магистерской работы: впервые показана способность бактерий вида *A. thiophilum* восстанавливать селенит-ионы и синтезировать наночастицы селена. Определен диапазон токсичных концентраций селенита натрия для бактерий *A. thiophilum*.

Научная и практическая значимость: Полученные результаты имеют широкую перспективу использования в процессах микробного восстановления оксоанионов селена при биоремедиации воды и земель, в качестве технологии производства различных биологически активных добавок к пище и удобрений, в нанотехнологии с целью получения наночастиц, состоящих из элементарного селена.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Бактерии вида *A. thiophilum* способны восстанавливать селенит-ионы с образованием наночастиц элементарного селена.

2. Изменение условий культивирования бактерий *A. thiophilum* позволяет получить наночастицы селена с определенными структурными и композиционными свойствами.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служила культура бактерий штамма *A. thiophilum* BV-S^T. Данный штамм относится к семейству *Rhodospirillaceae*, класса *Alphaproteobacteria*. Бактерии были выделены из серосодержащего источника, расположенного в Ставропольском крае, Северный Кавказ (Россия). Данный штамм поддерживается в Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

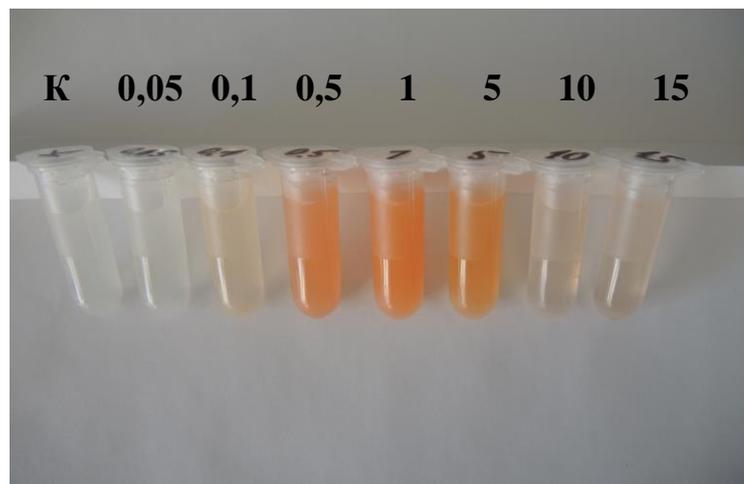
Для достижения поставленной цели и решения задач выращивали бактерии на синтетической малатной среде (СМС), определяли токсичные концентрации и способность к восстановлению селенита натрия для бактерий вида *A. thiophilum* BV-S^T, далее выделяли и очищали наночастицы селена, синтезированные бактериями вида *A. thiophilum* BV-S^T. Полученные наночастицы селена характеризовали методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), динамического рассеяния света (ДРС) и методами колебательной спектроскопии.

Структура магистерской работы. Работа изложена на 62 страницах и состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя следующие главы: обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение. Список использованных источников содержит 98 публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В данной работе была протестирована токсичность селенита натрия для штамма *A. thiophilum* BV-S^T. Для исследуемого штамма при выращивании в аэробных условиях в течение 18 ч наблюдалось ингибирование роста при концентрациях селенита натрия свыше 0,05-0,1 мМ. При этом, полное ингибирование роста культур было зафиксировано в диапазоне концентраций Na₂SeO₃ от 0,5 до 15 мМ.

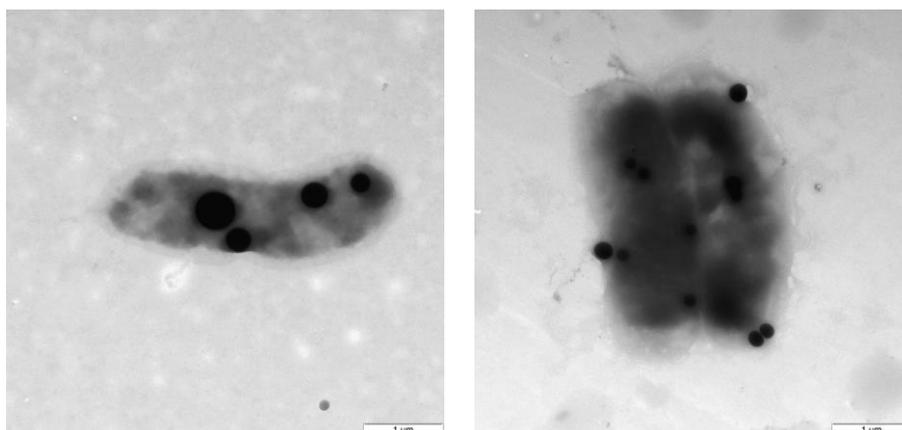
Далее было проведено исследование возможности восстановления селенита натрия на жидкой среде. Для изучения были взяты концентрации в диапазоне 0,05-15 мМ Na₂SeO₃. Уже через 72 ч было отмечено появление светло-оранжевой окраски при выращивании в присутствии 0,1-5 мМ, усиливающейся к окончанию времени культивирования (7 сут., рис. 1), что свидетельствует о способности штамма *A. thiophilum* BV-S^T восстанавливать селенит натрия. При концентрации 10-15 мМ рост азоспириллы почти не наблюдался на протяжении всего эксперимента, но был зафиксирован слегка розоватый оттенок, что говорит о возможном восстановлении селенита натрия при этих концентрациях.



К – контроль; 0,05-15 – различные концентрации Na₂SeO₃ в мМ.
Условия выращивания: 7 сут., СМС, аэробные условия культивирования, 31⁰С
Рисунок 1 – Восстановление селенита натрия штаммом *A. thiophilum* BV-S^T.

Мы сравнили полученные данные о восстановлении селенита натрия штаммом *A. thiophilum* BV-S^T с известными данными относительно *A. brasilense* Sp245 и Sp7 [1]. Для последних наблюдалось ингибирование роста при концентрациях селенита натрия свыше 0,8-0,2 мМ. При этом, полное ингибирование роста культур было зафиксировано в диапазоне концентраций селенита от 0,5-1 мМ, что на порядок ниже, чем для *A. thiophilum* BV-S^T. При концентрации 10 мМ рост азоспириллы не наблюдался на протяжении всего эксперимента, в отличие от *A. thiophilum* BV-S^T, у которого незначительный рост наблюдался даже при 10-15 мМ. Проведенные эксперименты показали, что штамм *A. thiophilum* BV-S^T способен выдерживать на порядок большие концентрации Na₂SeO₃ по сравнению с *A. brasilense* Sp245.

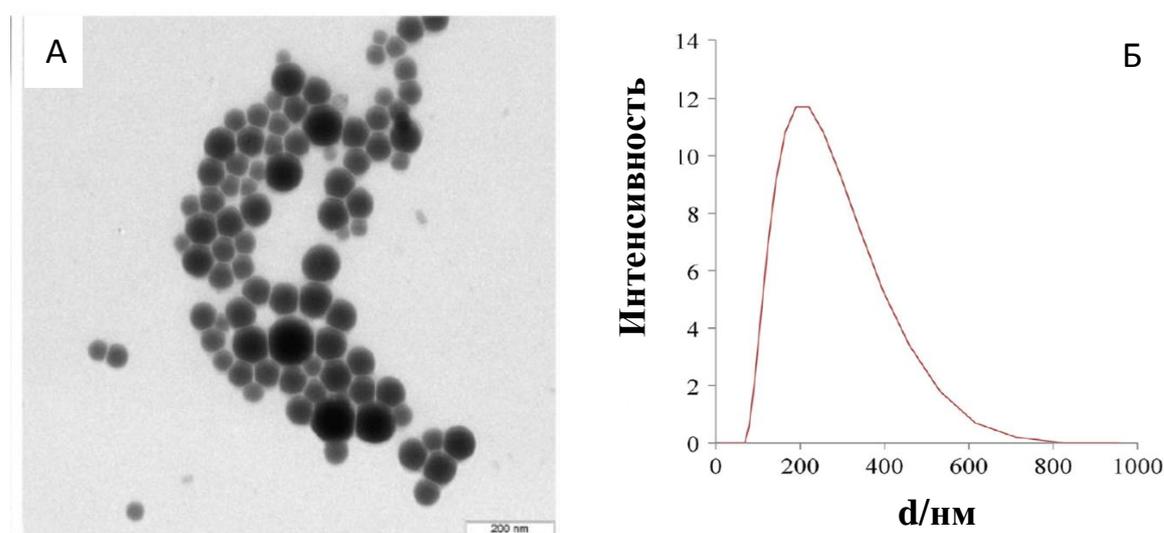
Также, мы проводили исследование возможности синтеза наночастиц селена штаммом *A. thiophilum* BV-S^T. Результаты, полученные с помощью ПЭМ, представлены на рисунке 2: в бактериальных клетках, выращенных на среде с добавлением селенита натрия наблюдались включения сферической формы размером от 80 до 500 нм.



Масштабная линейка – 1 мкм

Рисунок 2 – Просвечивающая электронная микроскопия штамма *A. thiophilum* BV-S^T, выращенного в присутствии 1 мМ Na₂SeO₃ в течение 7 сут.

Для дальнейших исследований выделяли и очищали наночастицы, синтезированные бактериями вида *A. thiophilum*. На рисунке 3 представлены выделенные и очищенные наночастицы селена (3А) и распределение по размерам биогенных наночастиц (3Б), определенное методом ДРС. Согласно проведенному анализу наночастицы селена имеют средний диаметр в пределах 160-250 нм. Дзета-потенциал наночастиц селена составил $-18,5$ мВ. Отрицательные значения дзета-потенциалов, очевидно, связаны с наличием отрицательно заряженных функциональных групп на поверхности наночастиц. Данное предположение подтверждается литературными данными [2], согласно которым бактериально синтезированные наночастицы могут быть покрыты слоем, содержащим различные биомакромолекулы (белки, полисахариды). Данные биомакромолекулы способны изменять поверхностный заряд наночастиц [2].



А – выделенные и очищенные наночастицы селена (масштабная линейка 200 нм);

Б – распределение по размерам наночастиц селена

Рисунок 3 – Результат ПЭМ и распределения по размерам наночастиц селена.

Далее наночастицы селена характеризовались методом ИК-фурье-спектроскопии (ИКФС). На рисунке 4 показан ИК-фурье спектр наночастиц селена, синтезированных бактериями вида *A. thiophilum*. На данном спектре четко различимы полосы, соответствующие различным биомакромолекулам: белкам, липидам и полисахаридам. На ИК-фурье спектре визуализируются типичные белковые полосы, такие как амид I (с двумя интенсивными полосами поглощения при 1656 см^{-1} и 1635 см^{-1} , амид II (с максимумом поглощения при 1542 см^{-1}) и малоинтенсивный амид III (также с двумя полосами поглощения при 1244 см^{-1} и 1228 см^{-1}). Присутствие карбоксильных групп (помимо отрицательного заряда наночастиц) выявлено в результате появления сопутствующей симметричной полосы $\nu_s(\text{COO}^-)$ при 1392 см^{-1} . Типичная область полисахаридных колебаний (в пределах $1200\text{-}1000\text{ см}^{-1}$) также характеризуется очень сильным поглощением. Кроме того, на фотографиях ПЭМ (рис. 3А) наночастиц селена отчетливо виден тонкий слой между соседними частицами, что позволяет предположить, что эти макромолекулы находятся на поверхности наночастиц.

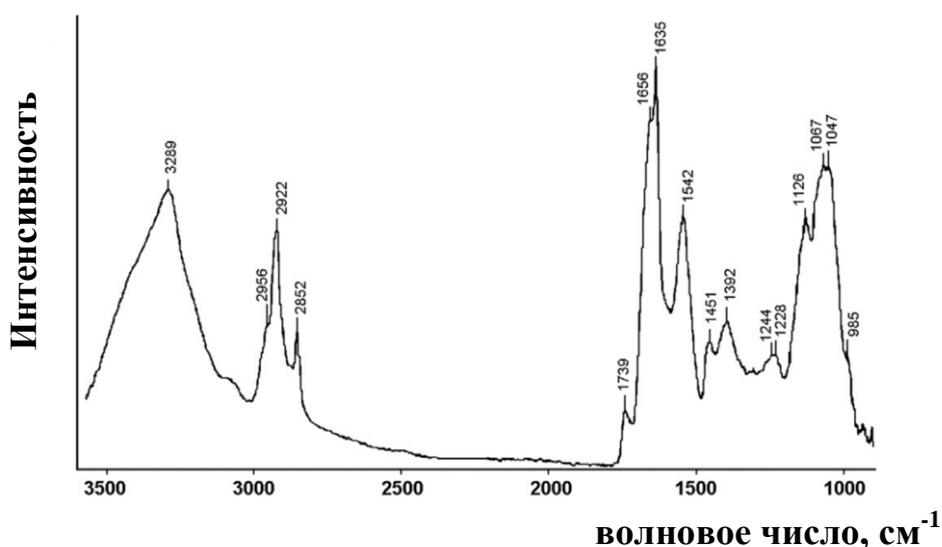


Рисунок 4 – ИК-фурье спектр выделенных и очищенных наночастиц селена, синтезированных бактериями вида *A. thiophilum* BV-S^T.

Полученные наночастицы селена также характеризовались с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния (СКР). Как известно, он чувствителен к различиям в аллотропных модификациях и кристалличности селена [3, 4], что является важным для изучения селеновых наноматериалов. Спектр комбинационного рассеяния наночастиц селена, синтезированных бактериями *A. thiophilum* BV-S^T, показал одну очень сильную полосу в нижней низкочастотной области (в области менее 500 см⁻¹) с максимумом поглощения при 250 см⁻¹, соответствующим аморфному селену [3, 4]. Данный спектр представлен на рисунке 5. Дополнительным свидетельством отсутствия кристалличности исследуемых наночастиц селена является отсутствие каких-либо других явно заметных близких (или перекрывающихся) полос более низких частот. Известно, что в некоторых биогенных наночастицах селена может присутствовать сера [5, 6], поэтому важно подчеркнуть, что проведенные спектроскопические исследования свидетельствуют о том, что в аморфных наночастицах селена нет никаких признаков присутствия серы.

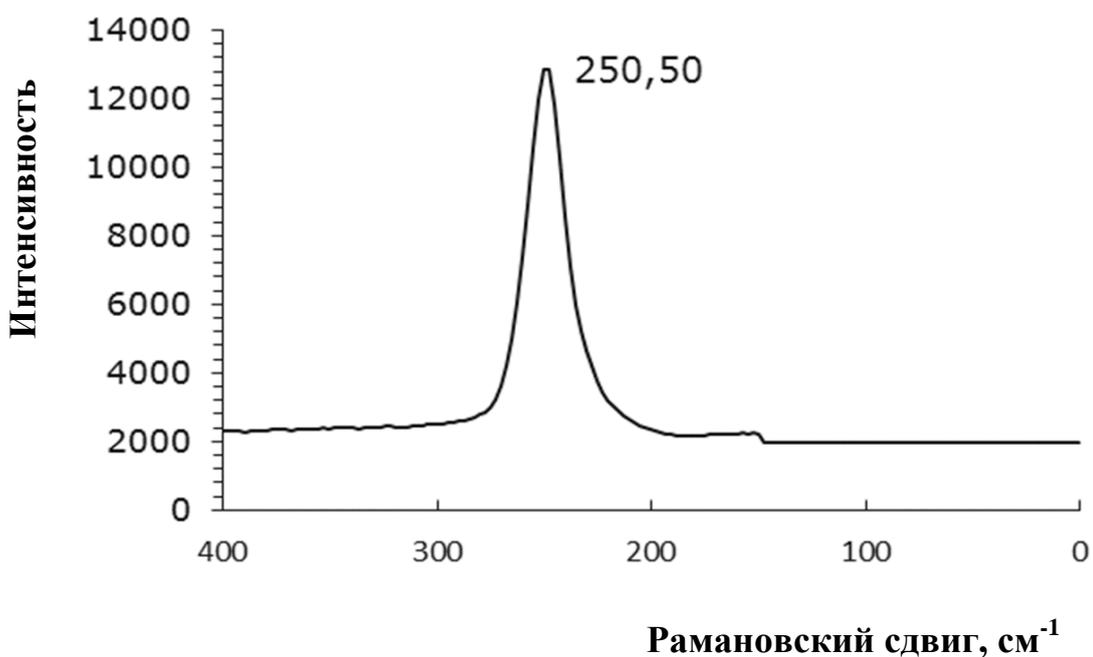


Рисунок 5 – Спектр комбинационного рассеяния наночастиц селена, синтезированных бактериями вида *A. thiophilum* BV-S^T.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии рода *Azospirillum* были и остаются популярным объектом исследования. Как и многие другие микроорганизмы, азоспириллы способны принимать участие в процессах трансформации токсичных соединений, в частности, оксоанионов селена до менее токсичных. Изучение биогенной трансформации особенно важно для процессов биоремедиации воды и земель, создания улучшенных удобрений, нанотехнологии и других областей.

В данной работе была показана способность к восстановлению селенит-ионов бактериями штамма *A. thiophilum* BV-S^T. При выращивании культуры в присутствии 0,1-5 мМ селенита в течение 7 сут. было зафиксировано красное окрашивание среды культивирования, что является признаком восстановления Na₂SeO₃ до элементарного селена. Было показано, что через 18 ч рост бактерий ингибировался даже при концентрации Na₂SeO₃ 0,05 мМ. При этом, полное ингибирование роста культуры было зафиксировано при концентрациях Na₂SeO₃ 0,5 мМ и выше. Было проведено сравнительное исследование токсичности селенита для штамма *A. thiophilum* BV-S^T с известными данными для *A. brasilense* Sp245. Было выявлено, что *A. thiophilum* BV-S^T в 10 раз более устойчив к селениту по сравнению с *A. brasilense* Sp245. С использованием ПЭМ было показано, что элементарный селен находится в клетках в виде сферических наночастиц диаметром от 80 до 500 нм.

В серии дальнейших экспериментов выделяли, очищали наночастицы селена и характеризовали их с помощью методов ПЭМ, ДРС и колебательной спектроскопии. С помощью ПЭМ было выявлено, что наночастицы селена относительно однородные по размеру. Согласно проведенному анализу, с помощью метода ДРС было показано, что наночастицы селена имеют средний диаметр в пределах 160-250 нм и дзета-потенциал, равный -18,5 мВ. ИКФС наночастиц селена выявила наличие различных биомакромолекул (белков, липидов, полисахаридов) на их поверхности. Анализ наночастиц селена с помощью СКР показал, что выделенные наночастицы состоят из аморфного элементарного селена.

ВЫВОДЫ

1. Определены токсичные концентрации Na_2SeO_3 для штамма *A. thiophilum* BV-S^T. При выращивании в аэробных условиях в течение 18 ч рост бактерий ингибировался уже при 0,05 мМ Na_2SeO_3 . Бактерии были способны преодолевать токсическое действие селенита натрия и на 7 сут. культивирования рост наблюдался при концентрациях до 5 мМ Na_2SeO_3 .

2. Показано восстановление Na_2SeO_3 в концентрациях 0,5-5 мМ до элементарного селена штаммом *A. thiophilum* BV-S^T. Восстановление Na_2SeO_3 идет с образованием наночастиц селена сферической формы с диаметром 80-500 нм, локализованных в основном внутри клеток.

3. Методом динамического рассеивания света и просвечивающей электронной микроскопии определен диапазон распределения по размеру и дзета-потенциал наночастиц селена, что составило 160-250 нм и $-18,5$ мВ, соответственно.

4. Методом ИК-фурье-спектроскопии показано присутствие различных биомолекул (белков, полисахаридов, липидов) на поверхности наночастиц.

5. С помощью спектроскопии комбинационного рассеивания показано, что наночастицы состоят из аморфного селена, что соответствует появлению в спектре полосы с максимумом поглощения при 250 см^{-1} .

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Reduction of selenite by *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles / A. V. Tugarova [et al.] // Microb. Ecol. 2014. V. 68. P. 495-503.
2. Extracellular polymeric substances govern the surface charge of biogenic elemental selenium nanoparticles / R. Jain [et al.] // Environ. Sci. Technol. 2015. V. 49. P. 1713-1720.
3. Identification of the fundamental vibrational modes of trigonal, α -monoclinic and amorphous selenium / G. Lucovsky [et al.] // Solid State Commun. 1967. V. 5, N 2. P. 113-117.
4. Van Overschelde, O. Photo-fragmentation of selenium powder by excimer laser ablation in liquids / O. Van Overschelde, G. Guisbiers // Opt. Laser Technol. 2015. V. 73. P. 156-161.
5. The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te / D. Zannoni [et al.] // Adv. Microb. Physiol. 2007. V. 53. P. 1-72.
6. Microbial transformations of selenite by methane-oxidizing bacteria / A. S. Eswayah [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101, N 17. P. 6713-6724.

