



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 298–303

*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2021, vol. 21, iss. 3, pp. 298–303

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-298-303>

Научная статья

УДК 577.151

## Получение жизнеспособных клеток *Azospirillum brasilense* SR80, инкапсулированных в альгинатный гидрогель



А. В. Коврижников<sup>1</sup>✉, Т. Е. Пылаев<sup>2</sup>, А. М. Захаревич<sup>1</sup>,  
С. А. Коннова<sup>1,2</sup>, М. А. Купряшина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

Коврижников Александр Викторович, студент 3-го курса биологического факультета, [alexander.kovrizhnikov@gmail.com](mailto:alexander.kovrizhnikov@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>

Пылаев Тимофей Евгеньевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии, [pylaev\\_t@ibppm.ru](mailto:pylaev_t@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2701-3333>

Захаревич Андрей Михайлович, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией диагностики наноматериалов и структур ОНИ НС и БС, [zaharevicham@yandex.ru](mailto:zaharevicham@yandex.ru)

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии; ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ИБФРМ РАН, [konnovasa@yandex.ru](mailto:konnovasa@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9607-8173>

Купряшина Мария Александровна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии, [kupryashina\\_m@mail.ru](mailto:kupryashina_m@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2136-5362>

**Аннотация.** В настоящее время агропромышленная отрасль испытывает высокую потребность в экологизации производства. Для решения данного вопроса значительная часть исследований направлена на получение препаратов с иммобилизованными бактериями, сохраняющими пролиферативную функцию и метаболическую активность. Почвенные ростостимулирующие бактерии рода *Azospirillum* не отличаются высокой конкурентоспособностью в ризосфере, а приемы иммобилизации могут способствовать интенсификации их физиологических возможностей. Целью настоящей работы было изучение иммобилизации азоспирилл в Са-альгинатные шарики. С использованием метода «мягкой» иммобилизации, основанном на физическом связывании, получены инкапсулированные в альгинатный гидрогель клетки *A. brasilense* SR80. Показано, что клетки сохраняют дыхательную активность и способность к росту во время иммобилизации, что подтверждает перспективность использования альгината в качестве матрицы для инкапсуляции азоспирилл.

**Ключевые слова:** *Azospirillum*, альгинат, иммобилизация, инкапсуляция, жизнеспособность

**Для цитирования:** Коврижников А. В., Пылаев Т. Е., Захаревич А. М., Коннова С. А., Купряшина М. А. Получение жизнеспособных клеток *Azospirillum brasilense* SR80, инкапсулированных в альгинатный гидрогель // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 298–303. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-298-303>

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Obtaining viable *Azospirillum brasilense* SR80 cells encapsulated in alginate hydrogel

А. В. Коврижников<sup>1</sup>✉, Т. Е. Пылаев<sup>2</sup>, А. М. Захаревич<sup>1</sup>, С. А. Коннова<sup>1,2</sup>, М. А. Купряшина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia

Aleksandr V. Kovrizhnikov, [alexander.kovrizhnikov@gmail.com](mailto:alexander.kovrizhnikov@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>

Timofey E. Pylaev, [pylaev\\_t@ibppm.ru](mailto:pylaev_t@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2701-3333>

Andrey M. Zaharevich, [zaharevicham@yandex.ru](mailto:zaharevicham@yandex.ru)

Svetlana A. Konnova, [konnovasa@yandex.ru](mailto:konnovasa@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9607-8173>

Maria A. Kupryashina, [kupryashina\\_m@mail.ru](mailto:kupryashina_m@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2136-5362>



**Abstract.** Significant researches aimed at the greening of agro-industrial production are focused on obtaining immobilized bacterial preparations with preserved proliferative function and metabolic activity. Herein, we investigated the possibility of bacteria of the genus *Azospirillum* to be immobilized in Ca-alginate beads. *A. brasilense* SR80 cells, encapsulated in an alginate hydrogel, were obtained using the “soft” immobilization method based on physical binding. We demonstrated the retained respiratory activity and growth ability of the bacteria during immobilization, thus confirming the advantageous prospects of alginate templates for azospirilla encapsulation.

**Keywords:** *Azospirillum*, alginate, immobilization, encapsulation, viability

**For citation:** Kovrizhnikov A. V., Pylaev T. E., Zaharevich A. M., Konnova S. A., Kupryashina M. A. Obtaining viable *Azospirillum brasilense* SR80 cells encapsulated in alginate hydrogel. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2021, vol. 21, iss. 3, pp. 298–303. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-298-303>

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Постоянно растущее население земли, развивающиеся медицина, сельское хозяйство, химические и энергетические отрасли промышленности вкуче с индустриализацией обуславливают постоянный рост загрязнения окружающей среды. Одними из наиболее активных и опасных поллютантов являются синтетические красители [1]. От 2 до 50% от общего числа используемых на производствах красителей попадают в неизменном виде в сточные воды, что приводит к серьезному загрязнению поверхностных и грунтовых вод [2]. Для решения проблем очистки загрязненных сред и восстановления нарушенных экосистем все более активно используются биологические методы, которые могут быть рассмотрены как экономически обоснованная альтернатива химическим и физико-химическим методам [3]. Зачастую химические методы очистки предполагают применение агрессивных реагентов, в связи с этим приоритет отдается технологиям, основанным на использовании ферментативной активности микроорганизмов, позволяющим избежать вторичного загрязнения [4]. Биопрепараты с иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами, а также их ферментами, осуществляют эффективную биodeградацию как неорганических веществ, так и многих органоуполлютантов [5].

Показано, что почвенные ассоциативные диатрофы рода *Azospirillum* способны к деградации модельных препаратов лигнина и синтетических красителей [6, 7]. Однако из-за токсического влияния органоуполлютантов на бактерии ими утрачивается способность к эффективной деградации высоких концентраций ароматических соединений. Приемы иммобилизации могут способствовать интенсификации физиологических возможностей азоспирилл. Известно, что в иммобилизованном состоянии у бактериальных клеток повышаются каталитическая активность и устойчивость к действию неблагоприятных факторов внешней среды [8].

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было изучение возможности и анализ эффективности иммобилизации клеток *A. brasilense* SR80 в альгинатный гидрогель.

## Материалы и методы

В качестве объекта исследования был выбран штамм *A. brasilense* SR80 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Бактерии культивировали на жидкой малатно-солевой среде следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,002;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,02; яблочная кислота – 5,0;  $\text{NaOH}$  – 1,7;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2$  – 0,02; pH – 6,8. Посевным материалом служила 12-часовая культура, выращенная на среде того же состава.

2-суточную бактериальную культуру осаждали центрифугированием. 1 г бактериальных клеток растворяли в 5 мл фосфатно-солевого буфера и смешивали с 50 мл стерильного раствора 5% альгината натрия. Затем суспензию перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Для формирования Ca-альгинатных шариков добавляли получившийся раствор к 0.2 М  $\text{CaCl}_2$  по каплям с расстояния 20 см от поверхности раздела фаз через стерильный шприц. Полученные шарики дважды отмывали в свежем растворе 0.2 М  $\text{CaCl}_2$ , и хранили при 4 °С.

Качественно жизнеспособность клеток азоспирилл, иммобилизованных в Ca-альгинатные шарики, подтверждали высевом полученных образцов на плотную малатно-солевую среду. Культивирование проводили при 28 °С в течение 5–7 дней. Дыхательную активность бактериальных клеток оценивали стандартным резазурин-тестом с незначительными модификациями [9].

Количественный учет клеток до и после контакта с альгинатным гелем осуществляли путем посева опытных образцов на твердую малатно-солевую среду, используя метод серийных разведений. Количество выросших колоний выражали общим числом колониеобразующих единиц (КОЕ) [10].

Степень инкапсуляции бактериальных клеток в гранулах вычисляли по формуле:

$$A (\%) = (m_1 / (m_2 + m_3)) \times 100 \%,$$

где  $A$  – степень инкапсуляции, %;  $m_1$  – масса



альгинатных шариков после иммобилизации;  $m_2$  – масса бактериальных клеток, использованных при иммобилизации,  $m_3$  – масса альгината.

Исследования поверхностной морфологии носителя, иммобилизованных гранул гидрогеля, осуществляли методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на базе Научно-образовательного центра по направлению «Нанотехнологии» СГУ.

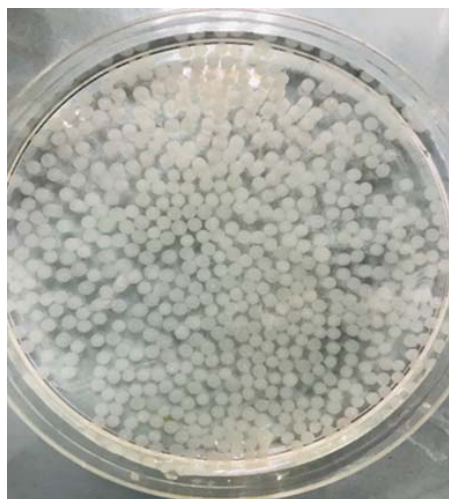
Все эксперименты проводились минимум в трех повторностях в трех независимых экспериментах. При оценке полученных результатов пользовались методом расчета стандартного отклонения среднего арифметического с использованием программы Microsoft Office Excel 2010; данные имеют соответствующие доверительные интервалы при уровне доверительной вероятности 0.95.

### Результаты и их обсуждение

Иммобилизация клеток – это широко распространенный в природе феномен, играющий особую роль в сохранении максимального числа каталитических функций. Часто в качестве носителя для иммобилизации используются именно природные материалы, в этом случае функционирование клетки в иммобилизованном состоянии

происходит естественно [11]. Однако матрицы для иммобилизации могут быть различными – как органические, так и неорганические. Выбор носителя – один из важнейших моментов в ходе процесса подготовки к иммобилизации. Носитель должен быть не токсичен, не загрязнять окружающую среду и не разлагаться микроорганизмами, при этом выдерживать высокую нагрузку клеточной массы. Он должен обладать высокой механической, биологической и химической стабильностью, иметь длительный срок хранения и низкую себестоимость [12]. В данной работе нами была проанализирована возможность иммобилизации бактерий *A. brasilense* SR80 в альгинатный гидрогель. Альгинат – это наиболее часто используемая матрица для инкапсуляции ризосферных бактерий, поскольку отвечает всем озвученным выше требованиям.

С применением метода «мягкой» иммобилизации были получены Са-альгинатные шарики с включенными в их структуру бактериальными клетками. Диаметр альгинатных шариков варьировал в пределах 2–3 мм (рис. 1, а). Для получения шариков правильной формы особое значение имели концентрация альгината и расстояние от поверхности раздела фаз. При уменьшении данных параметров шарики имели форму капли.



а/а



б/б

Рис. 1. Внешний вид приготовленных Са-альгинатных шариков: а – в растворе 0.2 М CaCl<sub>2</sub>, б – после 4 суток культивирования на малатно-солевой среде

Fig. 1. The external view of as-prepared Ca-alginate beads: а – in a 0.2 M CaCl<sub>2</sub> solution, б – after 4 days of cultivation on a malate-salt medium

Анализ степени инкапсуляции бактериальных клеток в гранулах показал, что использование 5% альгината в качестве матрицы приводит к получению выхода иммобилизованных клеток более 80%.

При этом размер образовавшихся пор в структуре шариков не приводит к естественному «вымыванию» клеток из альгинатного геля, что подтверждается данными подсчета КОЕ элюата (таблица).



**Характеристика Са-альгинатных шариков с иммобилизованными азоспириллами**  
**Characterization of Ca-alginate beads with immobilized azospirillas**

Средний размер, мм Average size, mm	Степень инкапсуляции, % The rate of incapsulation, %	КОЕ, кл./шарик CFU, cells per bead	КОЕ элюата, кл./мл CFU of eluate, cells/mL
2–4	82.19±1.7	$(3 \pm 0.4) \times 10^7$	210

Для выявления жизнеспособных клеток носители с иммобилизованными азоспириллами раскладывали на поверхность агаризованной малатно-солевой среды в чашках Петри. Через 4–6 суток культивирования регистрировали бактериальный рост (см. рис. 1, б). На поверхности шариков и рядом с ними на плотной питательной среде отмечали появление гладких выпуклых S-колоний кремово-белого цвета.

В качестве оценочного метода был применен общепринятый резазурин-тест [9]. Резазурин (входящий в состав коммерческого реагента Alamar Blue) восстанавливается ферментами живых бактериальных клеток с продукцией флуоресцирующего продукта – резорфина, выход которого коррелирует с дыхательной активностью. Данный тест изначально применялся для

работы с животными клетками, с относительно равномерным индексом метаболизма и сравнительно низкой скоростью пролиферации (1 деление в сутки). Поэтому перед использованием теста с бактериальными клетками были модифицированы условия его проведения в соответствии с особенностями объектов: время инкубации с клетками увеличено до 24 ч и (для получения выравненного сигнала) инкубационная среда заменена на фосфатно-солевой буфер (вместо малатно-солевой среды) для понижения пролиферативной активности бактерий.

Результаты измерения респираторной активности опытных образцов (иммобилизованных клеток), представленные на рис. 2, свидетельствуют о наличии жизнеспособных клеток в альгинатных шариках.

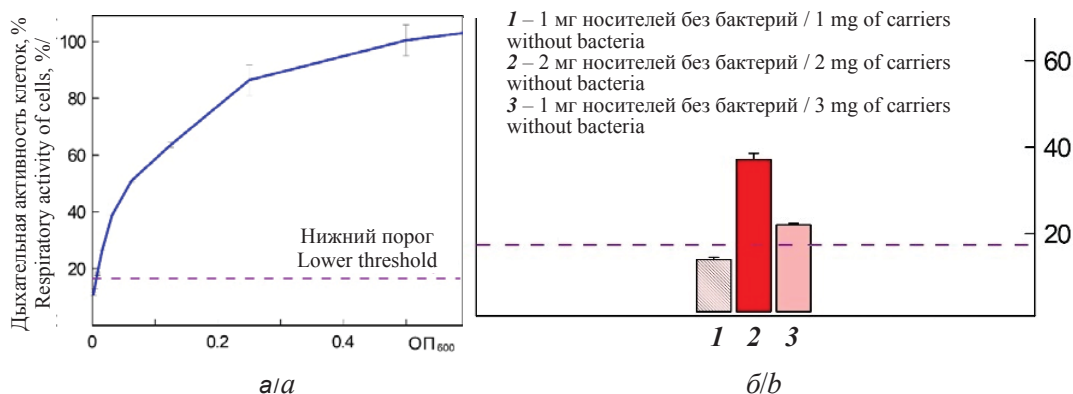


Рис. 2. Относительная дыхательная активность азоспирилл: а – суспензионные клетки (калибровочная кривая), б – иммобилизованные клетки. Нижний порог определен по базовой линии (сигнал/шум). За 100% принята дыхательная активность суспензии бактерий с ОП<sub>600</sub> = 0.5

Fig. 2. Relative respiratory activity of azospirillum: a – suspension cells (calibration curve), b – immobilized cells. The lower threshold corresponds to the signal-to-noise background. The respiratory activity of the bacterial suspension with OD<sub>600</sub> = 0.5 is set as 100%

Для наглядного подтверждения иммобилизации клеток на поверхности сорбента, анализа распределения клеток по его поверхности, а также для оценки морфофизиологического состояния иммобилизованных клеток применялась СЭМ. Как видно из СЭМ-изображений, Са-альгинатные шарики обладали сферической формой, имели компактную внешнюю структуру с относительно гладкой поверхностью без явных повреждений матрицы, диаметр гранул составлял около 1 мм

(после дегидратации). На поверхности иммобилизованных шариков визуализировались поры, отмечалось отсутствие бактериальных клеток (рис. 3, а).

Внутренняя структура Са-альгинатных шариков с иммобилизованными азоспириллами, а также контрольных, без включения бактерий представлены на рис. 3, б. На ЭМ-изображении отчетливо видны альвеолоподобные структуры, каналы и поры, подобная морфология увеличи-

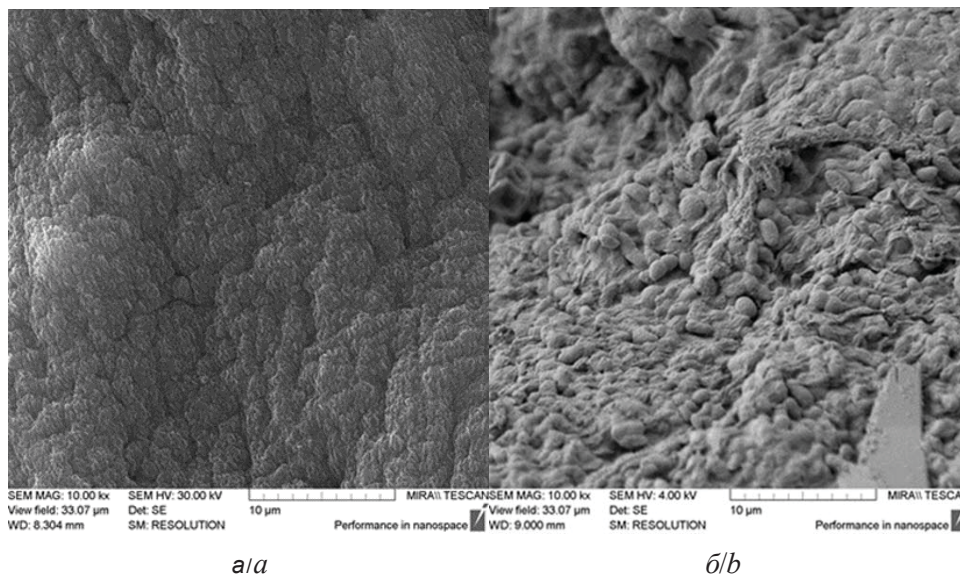


Рис. 3. СЭМ-изображения Са-альгинатных шариков: а – контроль, б – иммобилизованные клетками азоспирилл

Fig. 3. SEM images of Ca-alginate beads: a – control, b – with immobilized azospirillas

вает полезную площадь соприкосновения клеток с субстратом и оказывает положительное влияние на рост бактерий. В толще геля бактериальные клетки расположены однородно и имеют целостную структуру.

Таким образом, в ходе проведенного исследования были получены Са-альгинатные шарики с включенными в их структуру клетками *A. brasilense* SR80, с высоким выходом. В альвеолоподобной структуре полученных Са-альгинатных шариков детектированы бактериальные клетки, которые однородно расположены и имеют целостную структуру. С применением ряда методов было показано, что клетки *A. brasilense* SR80 сохраняют жизнеспособность в Са-альгинатном геле.

#### Список литературы

1. Lellis B., Fávaro-Polonio C. Z., Pamphile J. A., Polonio J. C. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms // *Biotechnology Research and Innovation*. 2019. Vol. 3, № 2. P. 275–290. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001>
2. Hazrat A. Biodegradation of Synthetic Dyes – A Review // *Water, Air, & Soil Pollution*. 2010. Vol. 213, № 1. P. 251–273. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0382-4>
3. John R. P., Tyagi R. D., Brar S. K., Surampalli R. Y., Prevost D. Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery // *Crit. Rev. Biotechnol*. 2011. Vol. 31, №3. P. 211–226. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>
4. Wang Q., Zhang S., Li Y., Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution // *J. of Environmental Protection*. 2011. № 2. P. 47–55.

5. Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies // *Bioresour. Technol*. 2000. Vol. 74. P. 63–67.
6. Kupryashina M. A., Petrov S. V., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ligninolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum* // *Microbiology*. 2015. Vol. 84, № 6. P. 791–795.
7. Kupryashina M. A., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ability of bacteria of the genus *Azospirillum* to decolorize synthetic dyes // *Microbiology*. 2020. Vol. 89, № 4. P. 451–458.
8. Park J. K., Chang H. N. Microencapsulation of microbial cells // *Biotechnol. Adv*. 2000. Vol. 18, № 4. P. 303–319.
9. Rampersad S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays // *Sensors (Basel)*. 2012. Vol. 12, № 9. P. 12347–12360.
10. Максимова Ю. Г., Максимов А. Ю. Иммобилизованные клетки и ферменты в биотехнологии : учеб. пособие. Пермь : Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2018. 88 с.
11. Beshay U., El-Enshasy H., Ismail I. M. K., Moawad H., ABD-El-Ghany S.  $\beta$ -glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant *Escherichia coli* cells in different matrices // *Pol. J. Microbiol*. 2011. Vol. 60, № 2. P. 133–138.
12. Vejan P., Khadiran T., Abdullah R., Ismail S., Dadrasnia A. Encapsulation of plant growth promoting Rhizobacteria prospects and potential in agricultural sector : A review // *J. Plant Nutr*. 2019. Vol. 42. P. 2600–2623.

#### References

1. Lellis B., Fávaro-Polonio C. Z., Pamphile J. A., Polonio J. C. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Bio-*



- technology Research and Innovation*, 2019, vol. 3, no. 2, pp. 275–290. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001>
2. Hazrat A. Biodegradation of Synthetic Dyes – A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2010, vol. 213, no. 1, pp. 251–273. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0382-4>
  3. John R. P., Tyagi R. D., Brar S. K., Surampalli R. Y., Prevost D. Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2011, vol. 31, no. 3, pp. 211–226. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>
  4. Wang Q., Zhang S., Li Y., Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. *Journal of Environmental Protection*, 2011, no. 2, pp. 47–55. <https://doi.org/10.4236/jep.2011.21005>
  5. Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.*, 2000, vol. 74, pp. 63–67. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3)
  6. Kupryashina M. A., Petrov S. V., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ligninolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum*. *Microbiology*, 2015, vol. 84, no. 6, pp. 791–795. <https://doi.org/10.1134/S0026261715060041>
  7. Kupryashina M. A., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ability of bacteria of the genus *Azospirillum* to decolorize synthetic dyes. *Microbiology*, 2020, vol. 89, no. 4, pp. 451–458. <https://doi.org/10.1134/S0026261720040074>
  8. Park J. K., Chang H. N. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol. Adv.*, 2000, vol. 18, no. 4, pp. 303–319. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00040-9](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00040-9)
  9. Rampersad S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*, 2012, vol. 12, no. 9, pp. 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
  10. Maksimova Yu. G., Maksimov A. Yu. *Immobilizovannyye kletki i fermenty v biotekhnologii* [Immobilized Cells and Enzymes in Biotechnology]. Perm, Perm. Gos. nats. issled. un-t, 2018. 88 p. (in Russian).
  11. Beshay U., El-Enshasy H., Ismail I. M. K., Moawad H. ABD-El-Ghany S.  $\beta$ -glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant *Escherichia coli* cells in different matrices. *Pol. J. Microbiol.*, 2011, vol. 60, no. 2, pp. 133–138.
  12. Vejan P., Khadiran T., Abdullah R., Ismail S., Dadrasnia A. Encapsulation of plant growth promoting *Rhizobacteria* prospects and potential in agricultural sector: A review. *J. Plant Nutr.*, 2019, vol. 42, pp. 2600–2623. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659330>

Поступила в редакцию 05.05.21, после рецензирования 11.05.21, принята к публикации 14.05.21

Received 05.05.21, revised 11.05.21, accepted 14.05.21