

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* НА НОСИТЕЛЯХ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

© 2024 г. М. А. Купряшина^{a, b, *}, Е. Г. Пономарева^a, Т. Е. Пылаев^{a, b}

^aИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Саратов, 410049, Россия

^bСаратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, 410012, Россия

*e-mail: kupryashina_m@mail.ru

Поступила в редакцию 08.08.2023 г.

После исправления 19.09.2023 г.

Принята к опубликованию 20.09.2023 г.

Для экологизации агропромышленного производства значительная часть исследований направлена на получение иммобилизованных препаратов бактерий, которые сохраняют способность к активному росту без потери метаболической активности, как во время иммобилизации, так и после длительного хранения и биотехнологического использования. В данной работе исследована возможность иммобилизации клеток бактерий рода *Azospirillum* на натуральных и синтетических носителях. Проанализирована эффективность иммобилизации в альгинатный гидрогель и вермикулит клеток штамма *A. brasilense* SR80. Оценен уровень пролиферативной и метаболической активности полученных препаратов. Показана перспективность использования вермикулита и альгината кальция в качестве матрицы для иммобилизации азоспирилл.

Ключевые слова: *Azospirillum*, иммобилизация, вермикулит, альгинатный гидрогель, метаболическая активность

DOI: 10.31857/S0026365624010097

В последние годы особое внимание уделяется технологиям, основанным на использовании ферментативной активности микроорганизмов (Wang et al., 2011; Chen et al., 2017). Известно, что у бактериальных клеток в иммобилизованном состоянии повышаются адаптивный потенциал, устойчивость к действию неблагоприятных факторов внешней среды, проявляется высокая каталитическая активность (Ившина и соавт., 1995; Park, Chang, 2000; Tripathi et al., 2010; Rathoreet et al., 2013; Ruan et al., 2018). Биотехнологические процессы, основанные на использовании иммобилизованных бактерий, существенно упрощены по сравнению с применением суспензионных клеток и, помимо возможности повторного использования, позволяют получить высокий выход целевых продуктов. Одним из способов сохранения и интенсификации ферментативных реакций микроорганизмов в природных условиях является феномен естественной иммобилизации (Beshay et al., 2011). При этом матрицы для иммобилизации могут быть как органическими, так и неорганическими (John et al., 2011). Главными критериями выбора носителя являются его инертность (нетоксичность) в отношении иммобилизуемых организмов, большая площадь поверхности,

механическая стабильность, способность к регенерации; кроме того, носитель должен обеспечивать максимальную проницаемость системы и быть рентабельным (Vejan et al., 2019).

Бактерии рода *Azospirillum* являются ключевым звеном в трансформации биогенных и абиогенных элементов в почве и образуют с растениями симбиозы, играющие важную роль в минеральном питании, продуктивности и адаптации растений к среде обитания (Fendrihan et al., 2017). В наших предыдущих исследованиях удалось установить, что почвенные ассоциативные diaзотрофы рода *Azospirillum* способны к продукции фенолоксиляющих ферментов, участвующих в биodeградации модельных препаратов лигнина и синтетических красителей (Никитина и соавт., 2010; Купряшина и соавт., 2012, 2015, 2020). Однако биотехнологическое использование азоспирилл имеет ряд ограничений, связанных со слабой устойчивостью бактерий к действию солнечной радиации, низких значений pH, высоких концентраций солей и тяжелых металлов. Процесс объединения носителя (твёрдого, жидкого или геля) с бактериальным штаммом имеет решающее значение для повышения

устойчивости азоспирилл к лимитирующим факторам окружающей среды.

Целью данного исследования было изучение возможности иммобилизации азоспирилл на носителях различной природы с сохранением метаболической активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Организмы и условия их культивирования. В качестве объекта исследования использован штамм *Azospirillum brasilense* SR80 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>). Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера (250 мл) на жидкой малатно-солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 —0.1; K_2HPO_4 —0.4; NaCl — 0.1;



образующегося в результате выветривания магнезиально-железистых слюд. Известно, что вермикулит обеспечивает активную микробную колонизацию, быстрое образование биопленки и ее адаптацию к различным видам загрязнений и природным условиям (Кобзев и соавт., 2001). На первом этапе в стерильных условиях 1 г носителя смешивали с 20 мл клеточной суспензии ($\text{ОП}_{600} = 1.0$) в синтетической среде. Сорбцию осуществляли в статических условиях в течение 2 сут при температуре 28°C. Для интенсификации процесса колбы переносили в холодильник, дальнейшую сорбцию вели 1 сут при температуре -4°C. Процесс адсорбции бактериальных клеток контролировали нефелометрически (при длине волны 600 нм). Для дальнейшего исследования неадсорбированные клетки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (рН 6.9). Взвесь осаждали центрифугированием, вермикулит с прикрепленными клетками азоспирилл хранили при температуре -4°C.

Иммобилизацию на активированном силикагеле проводили в плоскодонных колбах объемом 50 мл. К 2.5 г твердофазного носителя в стерильных условиях вносили 5 мл клеточной суспензии ($\text{ОП}_{600} = 1.0$) в синтетической среде, культивировали в течение 30 мин при комнатной температуре в статических условиях; неадсорбированные клетки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (рН 6.9) (Максимова, Максимов, 2018).

Иммобилизацию в альгинатный гидрогель проводили по следующей схеме: центрифугированием осаждали 2-сут бактериальную культуру, 1 г биомассы ресуспендировали в 5 мл фосфатно-солевого буфера (рН 6.9) и добавляли к 50 мл стерильного раствора 5% альгината натрия, перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Альгинатные шарики полимеризовали внесением получившейся суспензии в раствор 0.2 М CaCl_2 .

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 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; NaOH — 1.7; NH_4Cl — 1.0; CaCl_2 —0.02; рН 6.8. Среду стерилизовали в течение 30 мин при 121°C. Посевным материалом служила 12-часовая культура, выращенная на среде того же состава. Бактерии для исследования культивировали в термостате при температуре 37°C.

Иммобилизация нативных клеток азоспирилл. В качестве матриц для иммобилизации были выбраны вермикулит, альгинат и силикагель.

Иммобилизацию азоспирилл на поверхность твердофазного носителя (вермикулит) проводили в плоскодонных колбах объемом 50 мл. Был выбран вермикулит фракцией 2 мм марки “Вермисил”, который производится на основе природного минерала, следующего состава:

Полученные препараты отмывали и хранили в условиях бытового холодильника при 4°C в чистом растворе 0.2 М CaCl_2 .

Оценка жизнеспособности бактериальных клеток, иммобилизованных на различных носителях. Качественно наличие жизнеспособных иммобилизованных на различных носителях клеток азоспирилл подтверждали высевом полученных образцов на плотную малатно-солевою среду.

Кроме того, жизнеспособность бактериальных клеток, иммобилизованных на различных носителях, оценивали стандартным резазурин-тестом с незначительными модификациями (Rampersad, 2012). Резазурин (входящий в состав коммерческого реагента AlamarBlue) восстанавливается ферментами живых бактериальных клеток с продукцией флуоресцирующего продукта — резорубина, выход которого коррелирует с метаболической активностью (Rampersad, 2012). Для построения калибровочной кривой в лунках 96-луночного планшета делали серию двойных разведений суспензии бактерий в фосфатно-солевом буфере начиная с $\text{ОП}_{600} = 0.5$, объемом по 50 мкл. Затем в лунки добавляли 100 мкл рабочего раствора AlamarBlue (“Sigma”, США) с концентрацией 0.01 г/л, приготовленного на фосфатно-солевом буфере. Образцы инкубировали при температуре 28°C в течение 24 ч. Мониторинг дыхательной активности иммобилизованных бактерий проводили в 24-луночных культуральных полистироловых планшетах. Для этого в отдельные лунки вносили по 1 и 2 мг носителей с бактериями (опытные образцы) и без бактерий (отрицательный контроль). Флуориметрический анализ проводили на спектрофлуориметре Saгу Eclipse (“Agilent”, США). Значения интенсивности флуоресценции экспериментальных и контрольных образцов нормировались на бланк (раствор резазурина в фосфатно-солевом буфере, рН 6.9).

Анализ эффективности иммобилизации. С использованием метода серийных разведений проводили учет клеток до и после иммобилизации на носители. Количество выросших колоний выражали общим числом колониеобразующих единиц (КОЕ) (Максимова, Максимов, 2018).

Степень адсорбции бактериальных клеток вычисляли по формуле:

$$S = (S_{\text{исх}} - S_{\text{равн}}) \times 100\% / S_{\text{исх}},$$

где S — степень адсорбции, %; $S_{\text{исх}}$ — оптическая плотность суспензии до иммобилизации; $S_{\text{равн}}$ — оптическая плотность после иммобилизации.

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.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Исследования поверхностной морфологии носителей, иммобилизованных на них бактерий, а также отдельных бактериальных клеток, осуществляли на базе лаборатории диагностики наноматериалов и структур ОНИ НС и БС Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского с использованием растрового электронного микроскопа (ЭМ) высокого разрешения Mira\LMU (“Тескан”, Чехия). Пробоподготовку осуществляли следующим образом. Образцы фиксировали 1.5% глутаровым альдегидом (ГА), приготовленным на 10 мМ фосфатно-солевом буфере (рН 7.4) в течение 12 ч при температуре -4°C . Затем трижды промывали от ГА буфером с выдержкой по 10–15 мин и проводили постфиксацию 1% OsO_4 в течение 2 ч при температуре -4°C . Далее проводили дегидратацию образцов этанолом: 30% — 2-кратно с выдержкой по 10 мин, в 50% — 2-кратно с выдержкой по 10 мин, в 70% — 2-кратно с выдержкой по 10 мин, в 90% — 2-кратно с выдержкой по 10 мин, в 100% — однократно с выдержкой 10 мин; на последнем этапе сушили в 100% ацетоне. Затем образцы наносили на кремниевую липкую ленту. Непосредственно перед измерением образцы напыляли золотом на установке Emitech K450X (“Quorum Technologies Ltd”, Великобритания), съемку ЭМ-изображений производили с ускоряющим напряжением 20 кВ.

Определение полифенолоксидазной активности. Ферментативную активность детектировали спектрофотометрически по скорости окисления 2,6-диметоксифенола (“Acros Organics”, США; $\varepsilon = 30.5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) при длине волны 468 нм ($\varepsilon = 30.5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) (Paszczynski, Crawford, 1988).

Состав реакционной смеси (2 мл): 50 мМ Na-тарtratный буфер (рН 4.5), 1 мМ 2,6-диметоксифенол, образец (500 мкл). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка. О содержании белка судили по количественной реакции с реактивом Бредфорд (Bradford, 1976).

Для сравнительного анализа уровня активности иммобилизованных на вермикулите азоспирилл со свободными клетками в экспериментальные колбы с малатно-солевой средой и фосфатно-солевым буфером вносили клетки в эквивалентных концентрациях (3×10^7 кл./мл). Измерения проводили в одинаковых условиях инкубации, уровень активности выражали в единицах на 1 мл инкубационной смеси.

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводили минимум в трех повторностях в трех независимых экспериментах. При оценке полученных результатов использовали метод 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 ОБСУЖДЕНИЕ

Получение иммобилизованных клеток азоспирилл. В данной работе нами была проанализирована возможность иммобилизации бактерий рода *Azospirillum* на примере штамма *A. brasilense* SR80 на 3 матрицах: силикагель, вермикулит и альгинатный гель.

При иммобилизации живых бактериальных клеток часто используют метод адсорбции, то есть иммобилизации клеток на поверхности носителя при отсутствии диффузионного барьера (Ившина и соавт., 1995). Если в биотехнологии используют растущие культуры, то в этом случае адсорбция является первым этапом образования биопленки и происходит на стадии инокуляции твердого субстрата (Максимов и соавт., 2007). В качестве твердофазной подложки для иммобилизации клеток азоспирилл методом адсорбции нами был выбран вермикулитовый сорбент. Стандартная методика проведения иммобилизации, включающая инкубацию вермикулита с бактериальной суспензией,

Таблица 1. Степень адсорбции бактериальных клеток на вермикулите

Образец	Адсорбция, %	КОЕ элюата, кл./мл
1 этап иммобилизации	55.28 ± 2.3	$(3.5 \pm 0.6) \times 10^5$
2 этап иммобилизации, интенсификация, -4°C	82.19 ± 1.7	$(2.3 \pm 0.35) \times 10^5$

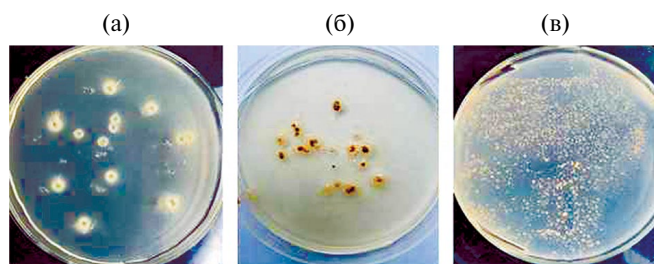


Рис. 1. Оценка жизнеспособности клеток азоспирилл, иммобилизованных на различные носители при высеве на плотную питательную среду: а — Са-альгинатные шарики; б — вермикулит; в — силикагель.

показала низкие значения адсорбции клеток (табл. 1), хотя количество клеток в исходной суспензии составляло 3×10^8 кл./мл. Основываясь на данных литературы (Лейкин и соавт., 2009), была проведена интенсификация первого этапа иммобилизации, включающая инкубацию при -4°C , что позволило повысить степень адсорбции в 1.5 раза.

Из табл. 1 видно, что вермикулит, используемый в качестве матрицы, характеризуется высокой степенью адгезии по отношению к клеткам азоспирилл. При этом стоит отметить, что в присутствии сорбента не отмечалось резкого снижения роста бактериальной культуры, даже в элюате (неадсорбированные клетки) титр бактериальных клеток был достаточно высок, что свидетельствует об отсутствии ингибирующего действия сорбента на размножение бактерий.

Мы использовали метод “мягкой” иммобилизации, основанный на включении микробных клеток в альгинатный гель. Альгинат — это наиболее часто используемая матрица, для инкапсуляции ризосферных бактерий, поскольку он биоразлагаем,

Таблица 2. Характеристика Са-альгинатных шариков с иммобилизованными азоспириллами

Размер шариков, мм	Степень инкапсуляции, %	КОЕ, кл./шарик	КОЕ элюата, кл./мл
2-4	82.19 ± 1.7	$(3 \pm 0.4) \times 10^7$	210

нетоксичен и биосовместим (Gombotz, Wee, 2012; He et al., 2019). В результате поэтапной иммобилизации были получены шарики Са-альгинатного гидрогеля с включенными в их структуру бактериальными клетками. Как видно из представленных данных, плотная структура геля (5%) позволила предотвратить естественное вымывание клеток из толщи шарика (о чем свидетельствуют низкие значения КОЕ элюата) и обеспечить высокую степень инкапсуляции (табл. 2).

При получении иммобилизованных клеток азоспирилл методом ковалентного связывания с активированным силикагелем, мы столкнулись с проблемой: титр клеток элюата после иммобилизации свидетельствовал, что эффективность иммобилизации крайне мала.

Для подтверждения того, что процесс иммобилизации прошел эффективно, и бактериальные клетки находятся на/в носителе, а также сохранили свою жизнеспособность, были проведены дальнейшие исследования.

Оценка жизнеспособности бактериальных клеток, иммобилизованных на различных носителях. Для выявления жизнеспособных клеток, носители с иммобилизованными азоспириллами раскладывали на поверхность агаризованной малатно-солевой среды в чашках Петри, проводили культивирование

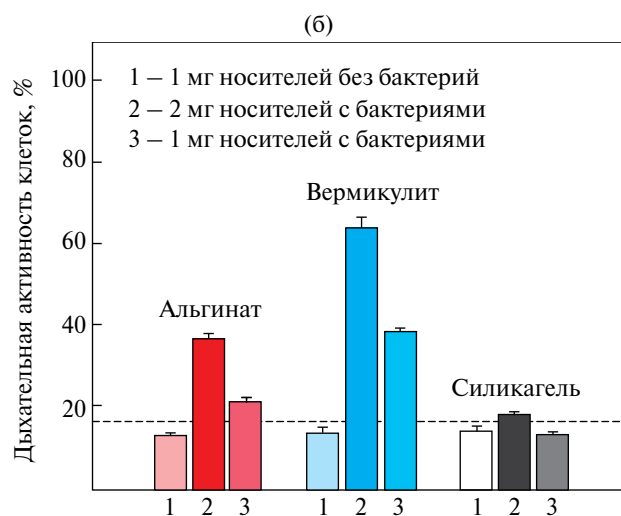
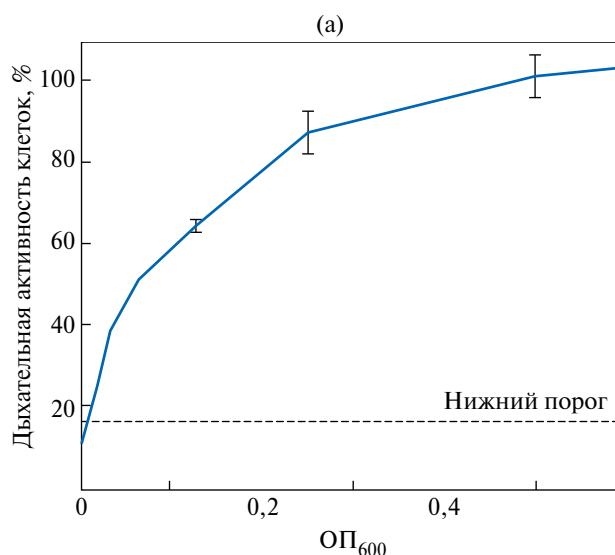


Рис. 2. Относительная дыхательная активность суспензии бактерий (а — калибровочная кривая) и иммобилизованных бактерий (б) на трех типах носителей: альгинатных шариках, вермикулите и силикагеле. Нижний порог определен по базовой линии (сигнал/шум). За 100% принята дыхательная активность суспензии бактерий с $\text{ОП}_{600} = 0$.

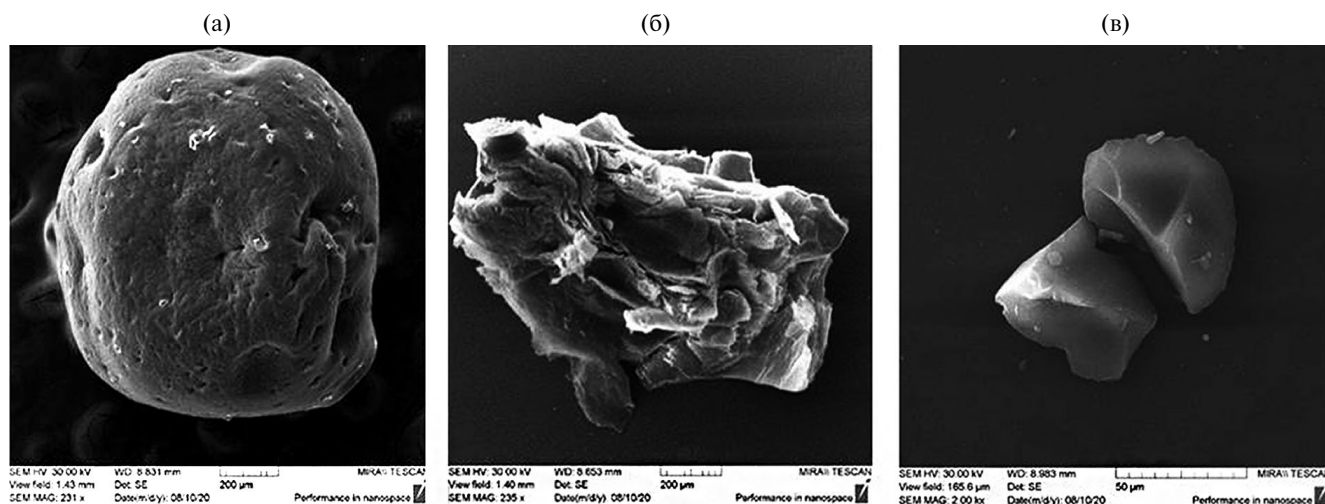


Рис. 3. СЭМ-изображения Са-альгинатных шариков (а), вермикулита (б) и силикагеля (в), иммобилизованных клетками азоспирилл.

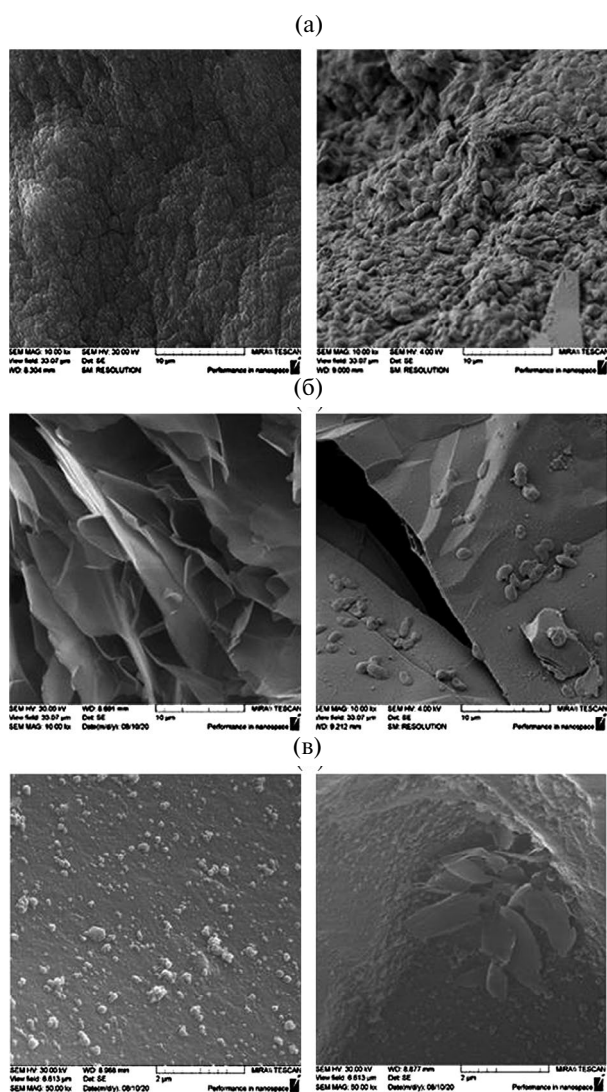


Рис. 4. СЭМ-изображения структуры Са-альгинатных шариков (а), вермикулита (б) и силикагеля (в), контрольных (1) и иммобилизованных клетками азоспирилл (2).

и отмечали образование бактериальных колоний рядом с препаратами (рис. 1).

С помощью резазурин-теста была оценена метаболическая активность азоспирилл, находящихся в суспензионном и иммобилизованном состоянии (рис. 2). Результаты измерения респираторной активности опытных образцов (иммобилизованных клеток) свидетельствуют о наличии жизнеспособных клеток на носителях альгинатных шариков и вермикулите и полном ее отсутствии на силикагеле.

Оценка морфофизиологического состояния клеток в иммобилизованном состоянии. Далее полученные препараты анализировали с применением сканирующей электронной микроскопии. Оценивали распределение клеток и их морфологию на поверхности сорбента и внутри матрицы. На рис. 3 представлен внешний вид используемых носителей.

Вермикулит и силикагель представляли собой образования неправильной формы. На поверхности силикагеля отмечалось незначительное присутствие мелких частиц. Поверхность вермикулита имела пористую, пластинчатую структуру. 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) (рис. 3а). Внутренняя структура иммобилизованных азоспириллами Са-альгинатных шариков, а также контрольных, без включения бактерий в их структуру, представлены на рис. 4а. На СЭМ-изображении отчетливо видны альвеолоподобные структуры, каналы и поры; подобная морфология увеличивает полезную площадь соприкосновения клеток с субстратом и оказывает положительное влияние на рост бактерий. В толще геля бактериальные клетки расположены однородно и имеют целостную структуру.

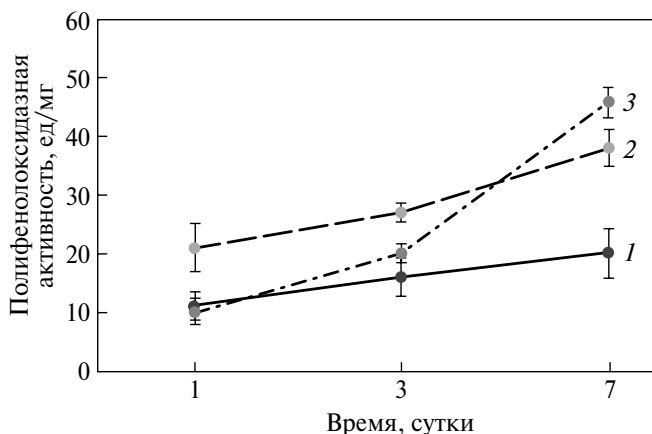


Рис. 5. Изменение удельной активности полифенолоксидазы суспензионных (1), иммобилизованных на вермикулите (2) и на альгинатных шариках (3) клеток *A. brasilense* SR80.

На СЭМ-изображениях иммобилизованных частиц вермикулита также детектировались бактерии. Нами был отмечен различный характер прикрепления азоспирилл к поверхности вермикулита: визуализировались как единичные клетки, так и их скопления, заключенные в общий матрикс. На микрофотографиях отчетливо видны жгутики и пилы.

На поверхности частиц силикагеля нам не удалось обнаружить присутствие прикрепленных бактериальных клеток (рис. 4в), что согласуется с данными резазурин-теста (рис. 2).

Полифенолоксидазная активность препаратов иммобилизованных азоспирилл. На следующем этапе исследования нами был проведен анализ метаболической эффективности иммобилизации азоспирилл, а именно исследован уровень полифенолоксидазной активности иммобилизованных клеток в сравнении с суспензионными. Как видно из представленного графика (рис. 5), были выявлены различия в удельной активности полифенолоксидазы свободными и иммобилизованными клетками.

С увеличением времени инкубации метаболическая активность иммобилизованных клеток возрастала. Так, активность полифенолоксидазы в среде с иммобилизованными на вермикулит клетками увеличилась в 3.5 раза, а инкапсулированных в альгинатный гидрогель — в 4.5 раза по сравнению с данными первых суток культивирования. Стоит отметить, что полифенолоксидазная активность суспензионных клеток на 7 сут выращивания была значительно ниже иммобилизованных (рис. 5). В ходе эксперимента отмечено “высвобождение” клеток с поверхности вермикулита и толщи Са-альгинатного гидрогеля, о чем свидетельствовало увеличение титра свободных клеток в среде. Хранение в течение 6 мес. при 4°C иммобилизованных на вермикулите клеток азоспирилл

снижало их ферментативную активность в сравнении с измеренной в начале эксперимента на $19 \pm 5\%$, а при использовании в качестве матрицы альгинатного геля — на $30 \pm 5\%$. Активность суспензионных клеток при аналогичных условиях хранения не обнаруживалась.

Таким образом, с использованием приемов, основанных на физическом и химическом связывании, проведены исследования по иммобилизации клеток бактерий рода *Azospirillum*. Показана возможность иммобилизации азоспирилл на носителях различной природы с сохранением метаболической активности. Установлено, что использование методик иммобилизации, предложенных в работе, позволяет получить клетки азоспирилл с увеличенной ферментативной активностью. Получены и частично охарактеризованы инкапсулированные в альгинатный гидрогель и иммобилизованные на вермикулите клетки *A. brasilense* SR80. Использование иммобилизованных ризобактерий активно внедряется в сельскохозяйственную практику, поскольку инкапсулированные клетки могут медленно высвобождаться в почву, обеспечивая более высокую эффективность инокулята в долгосрочной перспективе (John et al., 2011; Cesari et al., 2020). В связи с этим полученные данные представляются перспективными для дальнейшего использования в практических разработках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ государственной регистрации темы 121031100266–3).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность заведующему лабораторией диагностики наноматериалов и структур ОНИ НС и БС Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского Захаревичу А. М.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ившина И. Б., Бердичевская М. В., Зверева Л. В. Фенотипическая характеристика алканотрофных родококков

- из различных экосистем // Микробиология. 1995. Т. 64. С. 507–513.
- Кобзев Е. Н., Петрикевич С. Б., Шкидченко А. Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытой системе. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. С. 413–417.
- Kobzev E. N., Petrikevich S. B., Shkidchenko A. N. Investigation of the stability of an association of oil-degrading microorganisms in an open system // Appl. Biochem. Microbiol. 2001. V. 37. P. 416–417.
- Купряшина М. А., Петров С. В., Пономарева Е. Г., Никитина В. Е. Лигнинолитическая активность бактерий родов *Azospirillum* and *Niveispirillum* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 691–696.
- Kupryashina M. A., Petrov S. V., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ligninolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum* // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 791–795.
- Купряшина М. А., Пономарева Е. Г., Никитина В. Е. Способность бактерий рода *Azospirillum* к деколоризации синтетических красителей // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 453–461.
- Kupryashina M. A., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ability of bacteria of the genus *Azospirillum* to decolorize synthetic dyes // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 451–458.
- Купряшина М. А., Селиванов Н. Ю., Никитина В. Е. Выделение и очистка Mn-пероксидазы *Azospirillum brasilense* Sp245 // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. С. 23–26.
- Kupryashina M. A., Selivanov N. Yu., Nikitina V. E. Isolation and purification of Mn-peroxidase from *Azospirillum brasilense* Sp245 // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 17–20.
- Лейкин Ю. А., Черкасова Т. А., Смагина Н. А. Вермикулитовый сорбент для очистки воды от нефтяных углеводородов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 1. С. 104–117.
- Максимов А. Ю., Максимова Ю. Г., Кузнецова М. В., Олонцев В. Ф., Демаков В. А. Иммуобилизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 193–198.
- Maksimov A. Yu., Maksimova Yu. G., Kuznetsova M. V., Demakov V. A., Olontsev V. F. Immobilization of *Rhodococcus ruber* strain gt1, possessing nitrile hydratase activity, on carbon supports // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. P. 173–177.
- Максимова Ю. Г., Максимов А. Ю. Иммуобилизованные клетки и ферменты в биотехнологии / Учеб. пособие. — Пермь: Пермский гос. нац. исслед. ун-т, 2018. 88 с.
- Никитина В. Е., Ветчинкина Е. П., Пономарева Е. Г., Гоголева Ю. В. Фенолоксидазная активность бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 344–351.
- Nikitina V. E., Vetchinkina E. P., Ponomareva E. G., Gogoleva Yu. V. Phenol oxidase activity in bacteria of the genus *Azospirillum* // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 327–333.
- Beshay U., El-Enshasy H., Ismail I. M. K., Moawad H., ABD-El-Ghany S. β -Glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant *Escherichia coli* cells in different matrices // Pol. J. Microbiol. 2011. V. 60. P. 133–138.
- 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. V. 72. P. 248–254.
- Cesari A. B., Paulucci N. S., Yslas E. I., Dardanelli M. S. Immobilization of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* in alginate matrix for long time of storage maintains cell viability and interaction with peanut // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 10145–10164.
- Chen Q., Li J., Liu M., Sun H., Bao M. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment // PLoS One. 2017. V. 12. e0174445.
- Fendrihan S., Constantinescu F., Siciua O., Dinu S. *Azospirillum* strains as biofertilizers and biocontrol agents — a practical review // J. Adv. Agricult. 2017. V. 7. P. 1096–1108.
- Gombotz W. R., Wee S. F. Protein release from alginate matrices // Adv. Drug Deliv. Rev. 2012. V. 64. P. 194–205.
- He Y., Wu Z., Ye B., Wang Y., Guan X., Zhang J. Viability evaluation of alginate-encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 under simulated salt-stress conditions and its effect on cotton growth // Eur. J. Soil. Biol. 2016. V. 75. P. 135–141.
- 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. V. 31. P. 211–226.
- Park J. K., Chang H. N. Microencapsulation of microbial cells // Biotechnol. Adv. 2000. V. 18. P. 303–319.
- Paszczynski A., Crawford R. L., Huynh V.-B. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification // Methods Enzymol. 1988. V. 161. P. 264–270.
- Rampersad S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays // Sensors (Basel). 2012. V. 12. P. 12347–12360.
- Rathoreet S., Desai M. P., Liew V. C., Lai W. C., Paul W. S.H. Microencapsulation of microbial cells // J. Food Eng. 2013. P. 116. P. 369–381.
- Ruan B., Wu P., Chen M., Lai X., Chen L., Yu L., Gong B., Kang C., Dang Z., Shi Z., Liu Z. Immobilization of *Sphingomonas* sp. GY2B in polyvinyl alcohol-alginate-kaolin beads for efficient degradation of phenol against unfavorable environmental factors // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018. V. 162. P. 103–111.
- Tripathi A., Sami H., Jain S. R., Vilorio-Cols M., Zhuravleva N., Nilsson G., Jungvid H., Kumar A. Improved bio-catalytic conversion by novel immobilization process using cryogel beads to increase solvent production // Enzyme Microb. Technol. 2010. V. 47. P. 44–51.
- 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. V. 42. P. 2600–2623.
- Wang Q., Zhang S., Li Y., Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution // J. Environ. Protect. 2011. V. 2. P. 47–55.

Immobilization of *Azospirillum* Bacteria on Various Carriers

М.А. Купряшина^{1, 2, *}, Е.Г. Пonomарева¹, Т.Е. Пylaев^{1, 2}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049, Russia*

²*Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, 410012, Russia*

*e-mail: kupryashina_m@mail.ru

Received August 8, 2023; revised September 19, 2023; accepted September 20, 2023

Abstract—A significant part of research in environmentally friendly agroindustrial production is aimed at immobilized bacterial preparations with retained capacity for active growth without loss of metabolic activity both during immobilization and after long-term storage and biotechnological use. In the present work, immobilization of members of the genus *Azospirillum* on natural and synthetic carriers was investigated. Efficiency of immobilization of the cells of *A. brasilense* strain SR80 in alginate hydrogel and vermiculite was investigated. Proliferative and metabolic activities of immobilized preparations were investigated. The prospects of using vermiculite and calcium alginate as matrices for *Azospirillum* immobilization are shown.

Keywords: *Azospirillum*, immobilization, vermiculite, alginate hydrogel, metabolic activity