Raman spectroscopic characterization of selenite reduction by the bacterium *Azospirillum thiophilum* in the presence of an increased concentration of sulphate

Vladimirova A.A., Kamnev A.A., Tugarova A.V.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: vladimirova-nastyusha@bk.ru

Key message. In the biomass of *A. thiophilum* BV-S grown in the presence of 7 mM Na₂SO₄, Raman spectroscopy showed a peak at 348 cm⁻¹ (Se–S bond) in addition to a peak at 250 cm⁻¹ (amorphous modification of Se).

Keywords: selenium, nanoparticles, *Azospirillum thiophilum*, Raman spectroscopy

Many microorganisms, including *Azospirillum* [1, 2], can reduce toxic selenium oxyanions to non-toxic Se⁰. Investigation of this phenomenon may be of interest for bioremediation, bio- and nanotechnology, etc. *A. thiophilum* (isolated from a sulphur-containing source) is one of the least studied *Azospirillum* species. The features of the sulfur metabolism in *A. thiophilum* are of interest for studying possible ways of S involvement in the transformation of selenite ions. Note that *A. brasilense* was shown to form nanoparticles (NPs) containing both S and Se [3]. The aim of this work was to study SeO₃²⁻ reduction in the presence of an increased concentration of Na₂SO₄ by *A. thiophilum* BV-S. The investigation was carried out in two systems: aerobic bacterial growth (7 mM Na₂SO₄ and 1 mM Na₂SeO₃, 7 days, 31°C) and incubation in sterilised physiological saline solution (7 mM Na₂SO₄ and 5 mM Na₂SeO₃, 1 day, 32°C). Cell biomass and NPs were investigated using transmission electron microscopy (TEM) and Raman spectroscopy. To identify differences in sulphur metabolism, a comparative bioinformatics analysis of the *A. thiophilum* BV-S, *A. brasilense* Sp245 and Sp7 genomes was performed using the NCBI Genome web resource (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). TEM of biomass showed the presence of both cells and fairly uniform spherical electron-dense NPs, mainly localized outside the cells. Raman spectra of the biomass showed the appearance of peaks at 250 cm⁻¹, which corresponds to Se⁰ in its amorphous modification, and at 348 cm⁻¹, which corresponds to the Se–S bond. On the Raman spectra of biomass (after incubation), as well as of isolated NPs (both after growth and after incubation), only one peak at 250 cm⁻¹ was observed (showing the absence of S in Se NPs). Bioinformatics analysis showed that *A. thiophilum* BV-S has a number of sulphur metabolism genes that are absent in *A. brasilense* Sp245 and Sp7. The investigation on transformations of selenite ions may be of interest both for practical applications and for clarifying biogeochemical transformations of S and Se compounds.

Характеристика восстановления селенит-ионов бактерией *Azospirillum thiophilum* в присутствии повышенной концентрации сульфата методом спектроскопии комбинационного рассеяния

Владимирова А.А., Камнев А.А., Тугарова А.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

Аннотация. В биомассе штамма *A. thiophilum* BV-S, выращенного в присутствии 7 mM Na₂SO₄, методом спектроскопии комбинационного рассеяния показано наличие пика при 348 см⁻¹ (связь Se–S) в дополнение к пику при 250 см⁻¹ (аморфная модификация Se).

Ключевые слова: селен, наночастицы, *Azospirillum thiophilum*, спектроскопия комбинационного рассеяния

Многие бактерии, включая азоспириллы [1, 2], способны к трансформации токсичных оксоанионов селена до нетоксичного Se⁰. Изучение этого феномена актуально для биоремедиации, био- и нанотехнологии и т.д. *A. thiophilum* (выделенный из серосодержащего источника) является одним из наименее изученных видов азоспирилл. Особенности серного метаболизма *A. thiophilum* интересны с точки зрения изучения возможных путей включения S в процесс трансформации селенит-ионов. Так, у *A. brasilense* отмечено образование наночастиц (НЧ), содержащих S вместе с Se [3]. Целью работы было исследование восстановления Na₂SeO₃ в присутствии повышенной концентрации Na₂SO₄ штаммом *A. thiophilum* BV-S. Исследование проводили в двух системах: аэробное выращивание бактерий (7 mM Na₂SO₄ и 1 mM Na₂SeO₃, 7 сут, 31°C) и инкубация в стерильном физиологическом растворе (7 mM Na₂SO₄ и 5 mM Na₂SeO₃, 1 сут, 32°C). Биомассу клеток и НЧ исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и спектроскопии комбинационного рассеяния (СКР). Для выявления отличий в серном метаболизме проводили сравнительный биоинформатический анализ геномов *A. thiophilum* BV-S, *A. brasilense* Sp245 и Sp7 с помощью web-ресурса NCBI Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). ПЭМ биомассы показала присутствие как клеток, так и сферических электроноплотных достаточно однородных по размеру НЧ, преимущественно локализованных вне клеток. С помощью СКР выявлено, что при выращивании на спектрах биомассы наблюдаются пики при 250 см⁻¹, что соответствует Se⁰ в аморфной модификации [2], и при 348 см⁻¹, что соответствует связи Se–S [3]. На спектрах КР биомассы (после инкубации), а также выделенных НЧ (как после выращивания, так и после инкубации) наблюдается лишь один пик при 250 см⁻¹ (отсутствие S в НЧ Se). Биоинформатический анализ показал, что *A. thiophilum* BV-S имеет ряд генов серного метаболизма, отсутствующих у *A. brasilense* Sp245 и Sp7. Изучение трансформации селенит-ионов является актуальной задачей как для практического применения, так и в фундаментальном отношении – для выяснения биогеохимических превращений соединений S и Se.

1. Tugarova A.V. et al. Microb. Ecol. 68 (2014) 495-503.
2. Tugarova A.V. et al. New Biotechnol. 58 (2020) 17-24.
3. Vogel M. et al. J. Hazard. Mater. 344 (2018) 749-757.