

НАНОКОМПОЗИТЫ СЕЛЕНА В ПРИРОДНЫХ МАТРИЦАХ, ИХ ВЛИЯНИЕ НА КАРТОФЕЛЬ И ВОЗБУДИТЕЛЬ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ

А.И. Перфильева¹, И.А. Граскова¹, О.А. Ножкина¹, Б.Г. Сухов²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, alla.light@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

Аннотация. Синтезированы нанобиокмпозиты (НК) селена на основе полисахаридов арабиногалактана и крахмала. Изучено их влияние на фитопатогенную бактерию *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Показано отсутствие негативного влияния на рост бактерии предшественников НК арабиногалактана, крахмала. Исследуемые НК обладали бактерицидным и бактериостатическим эффектами. С применением витальных красителей выявлено, что после 24 ч инкубации НК вызывают изменения морфологии клеток – бактерии укорачиваются и утолщаются, погибают. Максимальным эффектом обладали НК селена в крахмале.

Ключевые слова: кольцевая гниль, картофель, наноселен, крахмал, арабиногалактан

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-626-629

В настоящее время широко исследуется использование наночастиц селена, как менее токсичных, с возможностью их адресной доставки в составе различных матриц к месту действия. Влияние нанокмпозитов (НК) селена, а также других элементов на жизнедеятельность бактерий, вызывающих заболевания сельскохозяйственных культур, мало изучено.

Целью нашей работы явилось изучение подавляющего действия нанокмпозитов селена с различными стабилизирующими матрицами, полисахаридами – арабиногалактаном и крахмалом, на картофель и жизнеспособность фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), как потенциальных средств оздоровления культурных растений от бактериальных патогенов.

Синтез нанокмпозитов осуществлялся на базе Иркутского института химии. Исходный арабиногалактан (АГ) представляет собой арабиногалактан лиственницы сибирской производства фирмы ООО «Химия древесины» (г. Иркутск) со средней Мм 40 кDa. В реакционную колбу помещали 1.000 г полисахарида арабиногалактана и 0.136 г бис(фенилэтил)диселенофосфината натрия, добавляли 50 мл воды. Раствор перемешивали на магнитной мешалке, термостатировали 3 ч при 35-40 °С и добавляли 5 мл концентрированного (30%) пероксида водорода. Выделение Se(0)-содержащего нанокмпозита и очистку его от образовавшегося дифенилфосфината натрия осуществляли выливанием реакционной смеси в четырехкратный избыток ацетона или этанола с последующей промывкой. Выход нанокмпозита с содержанием селена 3.4% составляет 97% (в пересчете на селен из его прекурсора и полисахарид). Полученный нанокмпозит представляет собой порошок оранжево-красного цвета, хорошо растворимый в воде.

Исходный крахмал (Sigma-Aldrich) со средней Мм 342 Da, 500 мг, растворяли в 30 мл воды и добавляли раствор 12 мг H₂SeO₃ в 3 мл воды. Через 10 минут добавляли 5 мг NaBH₄ и перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Образовавшийся НК высаживали в этиловый спирт и промывали. Получали красно-оранжевый порошок с содержанием селена 12.0%, выход 89% (в пересчете на селен из его прекурсора и полисахарид).

Формирование наночастиц красного аморфного Se^0 идентифицировали по появлению интенсивного поглощения в видимой области спектра (310 нм). Отсутствие каких-либо рефлексов на рентгеновской дифрактограмме нанокompозита также свидетельствует, что в данном случае реализуется известная рентгеноаморфная аллотропная модификация элементного селена. С использованием просвечивающего электронного микроскопа было выявлено, что наночастицы селена $\text{Se}(0)$ хорошо визуализируются и имеют форму, близкую к сферической. Размер наночастиц в НК Se/АГ составлял 20-65 нм, со средним значением 25 нм, в НК Se/К размер частиц составлял 20-90 нм, средний размер 40 нм. Наночастицы селена достаточно равномерно распределены в полисахаридных матрицах (рис. 1).

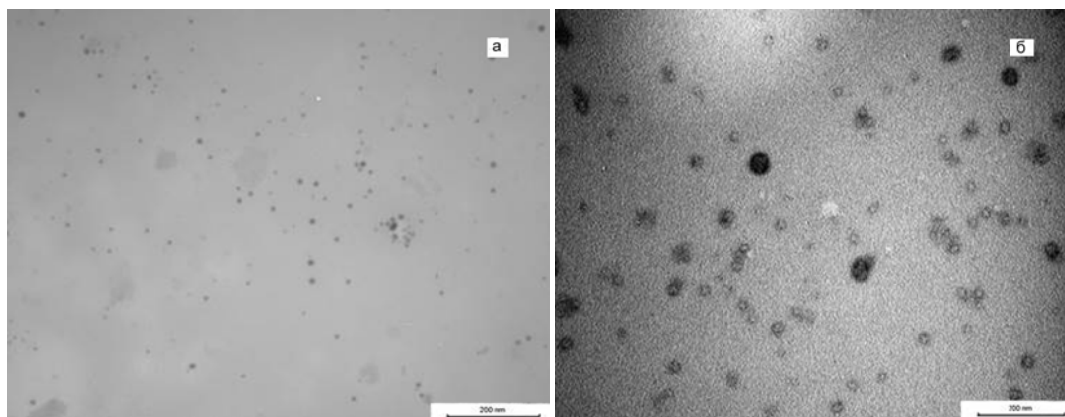


Рис. 1. Микрофотографии (ТЭМ) нанокompозитов селена Se/АГ (А), Se/К (Б).

Наночастицы селена инкапсулированы в макромолекулярные матрицы сильно разветвленных полисахаридов арабиногалактана и крахмала. Схему строения нанокompозитов на примере Se/АГ можно представить следующим образом (рис. 2).

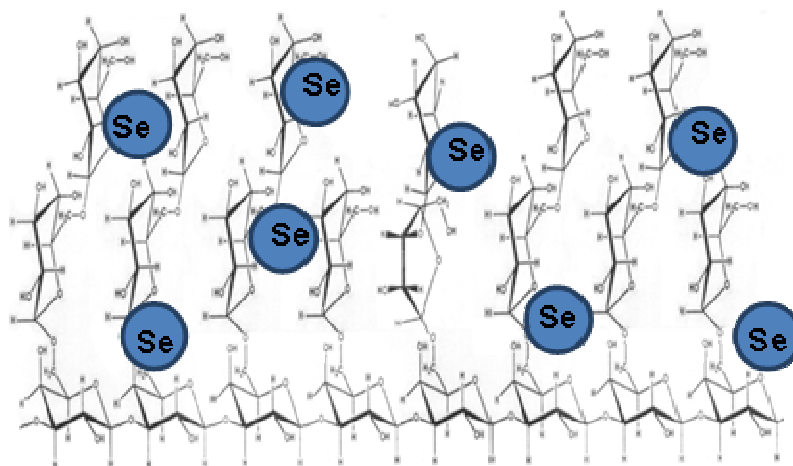


Рис. 2. Гипотетическая схема строения нанокompозита Se/АГ.

О способности нанокompозитов селена и нанокompозитов серебра подавлять жизнеспособность фитопатогенной бактерии судили по бактерицидному и бактериостатическому эффектам.

Ранее нами был показан токсический эффект нанокompозитов селена и арабиногалактана с содержанием селена 1.23%, полученный из неорганического предшественника – оксида селена 25, 27. Однако следовало проверить, каким будет влияние нанокompозита Se/АГ на жизнеспособность исследуемых бактерий,

содержание селена в котором увеличено почти в 3 раза (3.4%), и который получен из предшественника фосфорорганической природы – бис(2-фенилэтил) диселенофосфината натрия (БИС), а также содержащего еще большее количество селена (12%) нанокompозита Se/K.

Бактериостатический эффект был проверен нами с применением метода оценки плотности бактериальной суспензии. После инкубаций бактерий с нанокompозитами и их предшественниками в течение 1 сут нами было выявлено следующее. АГ и крахмал значительно стимулировали прирост бактериальной суспензии. Такой результат весьма логичен, так как сахара благоприятны для развития исследуемых бактерий. Предшественник нанокompозитов селена – БИС характеризовался бактериостатическим эффектом. Все изучаемые нанокompозиты проявили наличие бактериостатического эффекта, оптическая плотность суспензии после инкубации бактерий с ними была ниже, чем в контроле. Соответственно, нанокompозиты негативно влияют на рост и размножение бактерий *Cms*.

Изучаемые нанокompозиты в концентрации 0.000625% негативно влияли на рост и размножение бактерий *Cms*, это было обнаружено с применением метода посева колониеобразующих единиц (КОЕ). НК селена вызывают гибель бактерий до 36-46%.

При использовании красителя пропидий иодида, окрашивающего мертвые клетки, с применением ПЭМ были получены следующие результаты о наличии у нанокompозитов селена Se/АГ и Se/K бактерицидного эффекта (рис. 3).



Рис. 3. Влияние НКSe/АГ и НК Se/K на жизнеспособность бактерии *Cms* (верхний ряд фотографий представляет фото бактерий без красителя, нижний ряд – демонстрирует окрашивание мертвых клеток в красном диапазоне спектра).

Показано, что подавление жизнеспособности *Cms* происходит под воздействием наночастиц селена, диспергированных как в матрице арабиногалактана, так и в матрице крахмала. Согласно изображениям, представленным на фото, видно, что в вариантах с нанокompозитами больше мертвых клеток по сравнению с контролем (без нанокompозитов). Максимальное количество мертвых клеток (от 33% до 59% в поле зрения ПЭМ) наблюдалось при инкубации бактерий с нанокompозитом с матрицей крахмала, содержащей большее количество селена (12%), по сравнению с НК Se/АГ (3.4%), что свидетельствует о токсичности именно НК селена и их повышенной

биодоступности вследствие водорастворимости, приданной селену полисахаридными матрицами.

Статистическая обработка полученных результатов выявила, что при инкубации бактерий с нанокompозитами селена, независимо от матрицы, длина бактериальных клеток по сравнению с контролем значительно уменьшалась, а ширина увеличивалась на 9-22%.

Выявленные изменения морфологии клеток свидетельствуют о наличии неблагоприятных условий для бактерии, вероятно, при этом происходит нарушение осмотического статуса клетки, она меняет свою морфологию, превращаясь в менее вытянутую структуру.

Проведенные опыты показали, что при инкубировании бактерий *Cms* с нанокompозитами селена в различных матрицах (арабиногалактан, крахмал), бактерии испытывают стресс, который впоследствии приводит к их гибели, что подтверждается данными, полученными при использовании витальных красителей.

При изучении влияния исследуемых нанокompозитов на активность пероксидазы и биометрические показатели (прирост, количество листьев, длина междоузлий, масса корней и надземной части растения) не было выявлено негативного эффекта нанокompозитов на картофель. Предшественники – арабиногалактан не оказывали влияния на растения, а БИС ингибировал их прирост.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о возможности использования нанокompозитов селена и крахмала/арабиногалактана для создания препаратов, направленных на оздоровление картофеля от бактериальных заболеваний.

Работа поддержана грантом РФФИ и Правительством Иркутской области (проект № 17-416-380001).

SYNTHESIS OF NANOBIOCOMPOSITES OF SELENIUM AND THEIR INFLUENCE ON THE PHYTOPATHOGENIC BACTERIUM *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *SEPEDONICUS*

A.I. Perfilova¹, O.A. Noshkina¹, I.A. Graskova¹, B.G. Sukhov²

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, alla.light@mail.ru

²A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

Abstract. Nanobiocomposites of a selenium and silver on a basis potentially the metabolitnykh for microbes of polysaccharides of an arabinogalaktan are synthesized. Their influence on a phytopathogenic bacterium of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Absence of a negative impact on growth of a bacterium of predecessors of nanobiocomposites shown: arabinogalaktan. All researched nanobiocomposites reduced a gain of bacteria. Using vital dyes it is revealed that after 24 h an incubation the studied nanobiocomposites cause changes of morphology of cells – bacteria are shortened and thickened that leads to their death. Had the maximum effect a nanoselenium composit in starch. The received results demonstrate presence at a row of the researched nanobiocomposites of bactericidal effect. The further study and use of the received nanobiocomposites as means of address delivery of antimicrobic nanoparticles of a selenium to phytopathogens for their inactivation are advisable.

Keywords: *nanobiocomposites, selenium, starch, arabinogalaktan, Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus, microscopy, antibacterial activity*