

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ

И.А. Граскова¹, А.И. Перфильева¹, И.В. Клименков², Б.Г. Сухов³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, graskova@sifibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

Аннотация. Синтезированы наноконпозиты с содержанием селена и серебра, инкапсулированные в различные биогенные матрицы (арабиногалактан, крахмал, гуминовые кислоты). Изучено влияние этих наноконпозитов на жизнеспособность бактериального фитопатогена картофеля *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Показано, что исследуемые наноконпозиты обладают бактерицидным эффектом и отсутствием негативного влияния на растения картофеля.

Ключевые слова: наноконпозиты, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, картофель
DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1225-1228

Различные заболевания культурных растений, большинство из которых вызываются патогенными грибами и бактериями, широко распространены в современном растениеводстве. Бактерии р. *Clavibacter* поражают широкий круг культурных и сорных растений. Одним из представителей этого рода является *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) – возбудитель кольцевой гнили картофеля, и на сегодняшний день не существует эффективных способов борьбы с ним. Более того, в настоящее время отсутствуют химические и биологические агенты, способные ограничивать распространение бактериальных болезней картофеля. Необходимо разработать эффективные против бактерий и безопасные для растений агенты для оздоровления картофеля от фитопатогенной грамположительной бактерии *Cms* с применением препаратов на основе природных соединений.

Развитие нанотехнологий позволяет внедрять во многие сферы человеческой деятельности – медицину, сельское хозяйство и пищевую промышленность инновационные материалы, но, в целом, в фитопатологии наноконпозитные материалы практически не применяются.

В настоящей работе продемонстрирован экологически безопасный способ оздоровления картофеля от бактериальных патогенов с помощью разработанных нами наноконпозитов и выявлено их влияние на жизнеспособность бактерий *Cms* и биометрические показатели картофеля *in vitro*.

Исследования проводили на бактериях *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* штамм Ас-1405, полученного из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пущино. Для изучения бактериостатической активности использовали метод измерения оптической плотности бактериальной суспензии.

Синтез наноконпозита селен/крахмал (НК Se/K) проводили из крахмала с добавлением H_2SeO_3 . Синтез наноконпозита селен/арабиногалактан проводили из арабиногалактана и SeO_2 . Синтез наноконпозитов гуминовые вещества/серебро проводили из гуминовых веществ (ГВ), которые выделяли щелочной экстракцией из объектов монгольских месторождений: ГВ-гр – из грязей озера Гурван Нуур, ГВ-уг – из бурых углей Багануур, а также ГВ-уг – из сланцевых месторождений.

Исследования проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа LEO 906E (Carl Zeiss, Германия), электронного сканирующего микроскопа FEI Company Quanta 200. Структурные особенности поверхности бактериальных клеток определяли на сканирующем зондовом микроскопе (СЗМ) «СММ-2000», Зеленоград (Москва). Изображения получены в АСМ-режиме (атомно-силовом режиме) с использованием сверхострых и сверхмягких зондов модели MSNL-10 фирмы Bruker (номинальный радиус закругления зонда 2 нм). Полученные фотографии обрабатывали в программе «Scan master» версии 6.7.02 и «Gwyddion» версии 2.38.

Наноккомпозит арабиногалактан/селен. Наноккомпозит представляет собой красно-оранжевый порошок, хорошо растворимый в воде. Селеновые наночастицы хорошо визуализируются в просвечивающем электронном микроскопе и имеют форму, близкую к сферической, а также достаточно узкое размерное распределение (50-80 нм).

При совместном культивировании бактериального патогена с наноккомпозитом селен/арабиногалактан, а также его предшественников – чистый арабиногалактан и диоксид селена, было показано, что арабиногалактан не влияет на жизнеспособность бактерий. Диоксид селена подавлял рост суспензионных клеток патогена, а при добавлении наноккомпозита наблюдали наиболее выраженное подавление роста бактерий. Спустя 24 часа инкубации, бактериальные клетки изменяли свои размеры (например, длина уменьшалась в 2.5 раза) и слипались. По-видимому, наноккомпозит способен изменять мембранную проницаемость клеток бактерий, в результате чего наблюдается изменение размеров микробных клеток.

Также было изучено влияние наноккомпозита селен/арабиногалактан на растения картофеля *in vitro*. В качестве физиолого-биохимических параметров состояния растений использовали активность гваякол-зависимой пероксидазы и скорость прироста. Пероксидаза является маркером стрессового состояния растений, ее активность и изоферментный состав быстро изменяются при любом воздействии на растение. В контрольных растениях активность пероксидазы не изменялась и отмечался высокий прирост побегов. В варианте с добавлением арабиногалактана наблюдали незначительное повышение активности пероксидазы и постоянный прирост побегов. Добавление диоксида селена снизило активность пероксидазы и сильно подавляло рост побегов. В варианте с наноккомпозитом было отмечено незначительное стимулирование активности пероксидазы, прирост растений был на уровне контроля. Исследования влияния наноккомпозита арабиногалактан/селен демонстрируют наличие у него выраженного бактерицидного эффекта и отсутствие негативного влияния на рост и развитие растения.

Наноккомпозит крахмал/селен. Крахмал является самым распространенным углеводом. Структурные элементы этого полимерного соединения – молекулы глюкозы – могут использоваться многими микроорганизмами в пищевой цепочке. В процессе ассимиляции происходит усвоение питательных веществ и использование их для синтеза клеточных структур. В процессе диссимиляции питательные вещества разлагаются и окисляются, при этом выделяется энергия, необходимая для жизни микробной клетки. Поэтому была синтезирована антисептическая наноккомпозитная субстанция, у которой эффективные антимикробные свойства могут задаваться как наночастицами, так и трофическим для бактерий крахмалом, входящим в состав наноккомпозита.

Были получены наноккомпозиты, состоящие из наночастиц селена, упакованных в матрицу из крахмала (НК Se/K). С использованием просвечивающего электронного микроскопа было выявлено, что наночастицы селена Se(0) хорошо визуализируются и имеют форму, близкую к сферической. Размер наночастиц НК Se/K составлял 20-90 нм, средний размер – 40 нм. О способности наноккомпозита селена подавлять

жизнеспособность фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) судили по бактерицидному и бактериостатическому эффектам. Предшественник нанокompозитов селена – БИС характеризовался бактериостатическим эффектом. Крахмал стимулировал рост бактериальной культуры. Нанокompозит снижал жизнеспособность клеток примерно в 2 раза.

При использовании красителя пропидий иодида, окрашивающего мертвые клетки, с применением просвечивающей электронной микроскопии были получены следующие результаты, свидетельствующие о наличии у нанокompозита селена (Se/K) бактерицидного эффекта: в вариантах с нанокompозитами больше мертвых клеток по сравнению с контролем (без нанокompозитов). Высокое количество мертвых клеток (от 33% до 59 % в поле зрения ПЭМ) наблюдалось при инкубации бактерий с нанокompозитом с матрицей крахмала, содержащей селен (12%).

Статистическая обработка полученных результатов выявила, что при инкубации бактерий с нанокompозитом селена 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.

Наблюдаемый эффект снижения прироста бактерий и изменение их морфологии после инкубации с нанокompозитами, вероятно, связан с локальными деструктивными изменениями клеточной стенки бактерий. Было показано изменение жирно-кислотного состава бактерий после инкубации с нанокompозитами селена и арабиногалактана, при этом наблюдалось увеличение количества насыщенных жирных кислот. Такое изменение приводит к нарушению жидкостно-кристаллических свойств клеточных мембран бактерий, что, в свою очередь, может менять способность бактериальных клеток к агрегации, изменять их форму и даже приводить к разрушению клеточных мембран и гибели бактерий. Также более подробные исследования с использованием электронной микроскопии позволили нам обнаружить факт прикрепления наночастиц к поверхности бактериальной клетки, что, вероятно, приводит к нарушению ее окислительно-восстановительного потенциала.

В естественных условиях бактерии обычно испытывают недостаток питательных веществ, поэтому возможно применение изученного нанокompозита как носителя с адресной доставкой частиц селена, при использовании которых бактериями в качестве питательного средства впоследствии происходит нарушение их жизнедеятельности и гибель бактериального патогена. Результаты визуализации взаимодействия микробных клеток и НКSe позволяют предположить, что механизм действия нанокompозита на бактериальные клетки связан с изменением их мембранной проницаемости.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у нанокompозита селена с крахмальной матрицей бактерицидных и бактериостатических свойств в отношении кольцевой гнили картофеля, вызываемой *Cms*. Представленные данные свидетельствуют о возможности использования нанокompозита с наночастицами селена для обработки культурных растений против бактериальных заболеваний.

Гуминовые вещества/серебро. Гуминовые вещества выбраны в качестве матриц для наночастиц серебра, поскольку они представляют собой основной органический почвенный компонент, который также является первичным метаболитом для большинства микробов, находящихся в почве. Гуминовые вещества (ГВ) выделяли щелочной экстракцией из объектов монгольских месторождений: ГВ-гр – из грязей озера Гурван-Нуур, ГВ-уг – из бурых углей Багануур, а также ГВ-уг – из сланцевых месторождений. Серебро и НЧ серебра являются эксклюзивным антимикробным агентом, и мы подтвердили, что AgNO_3 не только значительно подавлял рост бактерий

Sms, но и негативно влиял на биометрические показатели растений. Для устранения этого негативного влияния использовали НК с НЧ серебра в матрицах различных по происхождению ГВ. Полученные результаты позволили выявить, что ГВ-гр способны стимулировать рост бактерий. Установлены максимально эффективные ингибирующие наноконпозиты – это НК ГВ-гр/Ag и НК ГВ-уг/Ag. Введение НЧ серебра в матрицы ГВ (НК ГВ-гр/Ag и НК ГВ-уг/Ag) усиливало их бактериостатический эффект, но в несколько меньшей степени, чем таковой, оказываемый нитратом серебра. Наблюдаемый бактериостатический эффект может быть связан с разрушением клеточной стенки бактерий, происходящим вследствие взаимодействия наночастиц с клеточной стенкой бактерий, которые изменяют окислительно-восстановительный потенциал клетки бактерии.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов с рядом веществ – как наноконпозитов, так и ГВ, были выявлены агенты, обладающие наибольшей бактериостатической активностью и отсутствием негативного влияния на растения картофеля. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у некоторых из исследуемых веществ (НК ГВ-гр/Ag, НК ГВ-уг/Ag) бактериостатических свойств и негативного эффекта при образовании биопленок в отношении кольцевой гнили картофеля, вызываемой *Sms*. При этом, положительным влиянием на растения характеризовался ГВ-гр наноконпозит, полученный из них НК ГВ-гр/Ag. Не оказывали выраженного негативного эффекта на картофель другие исследуемые наноконпозиты.

Представленные данные свидетельствуют о возможности использования наноконпозитов с наночастицами серебра для обработки культурных растений против бактериальных заболеваний.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск) и Объединенного Центра ультрамикрoанализа ЛИИ СО РАН (<http://www.lin.irk.ru/copp/rus/>).

ANTIBACTERIAL EFFECTS OF NANOCOMPOSITES

I.A. Graskova¹, A.I. Perfileva¹, I.V. Klimenkov², B.G. Sukhov³

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, graskova@sifibr.irk.ru

²Limnological Institute, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

³A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

Abstract. Nanocomposites containing selenium and silver, encapsulated in various biogenic matrices (arabinogalactan, starch, humic acids) were synthesized. The effect of these nanocomposites on the viability of the bacterial phytopathogen of potato *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* has been studied. It is shown that the studied nanocomposites have a bactericidal effect and no negative impact on potato plants.

Keywords: *nanocomposites, Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the potato