

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ЭФФЕКТА НАНОКОМПОЗИТОВ СЕРЕБРА НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ

О.А. Ножкина¹, А.И. Перфильева¹, И.А. Граскова¹, А.В. Сидоров¹, Б.Г. Сухов²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, smallolga@mail.ru

Аннотация. В работе были проведены исследования, направленные на изучение наночастиц серебра, которые были упакованы в различные гуминовые вещества, природного происхождения для переработки растений против фитопатогенов. Экспериментально были показаны антибактериальные свойства некоторых наноконпозитов и их предшественников. Вещества препятствуют росту бактерий и их способности к образованию биопленки, в то же время, не нанося вреда растениям.

Ключевые слова: наноконпозиты серебра, антибактериальные свойства, гуминовые вещества

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1321-1326

Известно, что серебро обладает бактерицидным эффектом [Граскова и др., 2018]. Одним из перспективных направлений не только в медицине, но и теперь в растениеводстве, стало изучение наночастиц серебра упакованных в различные матрицы, которые удобны в использовании и безопасны для растений, а также с помощью них осуществляется адресная доставка веществ в бактериальную клетку фитопатогена [Омельченко и др., 2014]. Это свойство серебра стало интересно для изучения его как средства защиты культурных растений от патогенов. Одним из ярких примеров такого патогена является кольцевая гниль картофеля, вызываемая бактерией *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* (*Cms*). Как правило, эти бактерии представляют собой прямые или слегка изогнутые палочки размером $0.4\text{--}0.75 \times 0.8\text{--}2.5$ мкм, неправильной формы и часто клино- или булавовидной формы, преимущественно одиночные, но часто в парах V-образной конфигурации и иногда расположенные полисадно [Van der Wolf et al., 2005]. Это облигатные аэробы, которые растут медленно, нуждаются в богатых питательных средах и некоторых факторах роста. Они являются хемоорганотрофами, с метаболизмом дыхательного типа и образованием небольшого количества кислоты из маннитола, сорбитола, глюкозы, у некоторых штаммов – из маннозы; каталазоположительные, оксидазоотрицательные, индол не образуют, нитрат не восстанавливают [Граскова и др., 2018].

Для распространения этого возбудителя благоприятными являются климатические условия Северо-Восточной и Центральной Европы, а также Канады. Ежегодный ущерб от кольцевой гнили в Европе достигает более 15 млн евро [Eichenlaub et al., 2011]. Несмотря на то, что *Cms* не является карантинным организмом в России, ареал распространения возбудителя в стране расширяется. По оценкам Европейской и Средиземноморской организации защиты растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) потери урожая картофеля в России от заболевания кольцевой гнилью могут достигать 47 % [Van der Wolf et al., 2005]. Фактором, затрудняющим борьбу с заболеванием, является отсутствие эффективных экологически безопасных средств защиты. Поэтому целью нашего исследования стало

изучение нанокompозитов содержащих серебро на основе гуминовых веществ различной природы, как одних из перспективных направлений в растениеводстве и как одних из перспективных средств борьбы с данным растительным патогеном.

В работе было исследовано влияние нанокompозитов серебра на основе гуминовых веществ и их предшественников на растительный патоген картофеля, возбудитель кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* штамма Ас – 1405, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов, ИБФМ РАН. Использовались нанокompозиты и их предшественники трех видов: НКГв – грязи/AgNO₃, НКГв – угли/AgNO₃, НКГв – сланцы/AgNO₃, Гв – грязи, Гв – угли, Гв – сланцы, полученные с месторождений на территории Монголии. Нанокompозиты были синтезированы в Иркутском институте химии им А. Е. Фаворского и хорошо растворимы в воде и удобны в использовании их водные растворы. Изучение бактерицидного эффекта нанокompозитов осуществляли путем измерения оптической плотности бактериальной суспензии, которую выращивали на жидкой питательной среде для бактерий. Измеряли оптическую плотность бактериальной суспензии в динамике с следующих точек: 0, 2, 4, 18, 24, 48, 66, 72, 92 часов при длине волны 595 нМ (рис. 1).

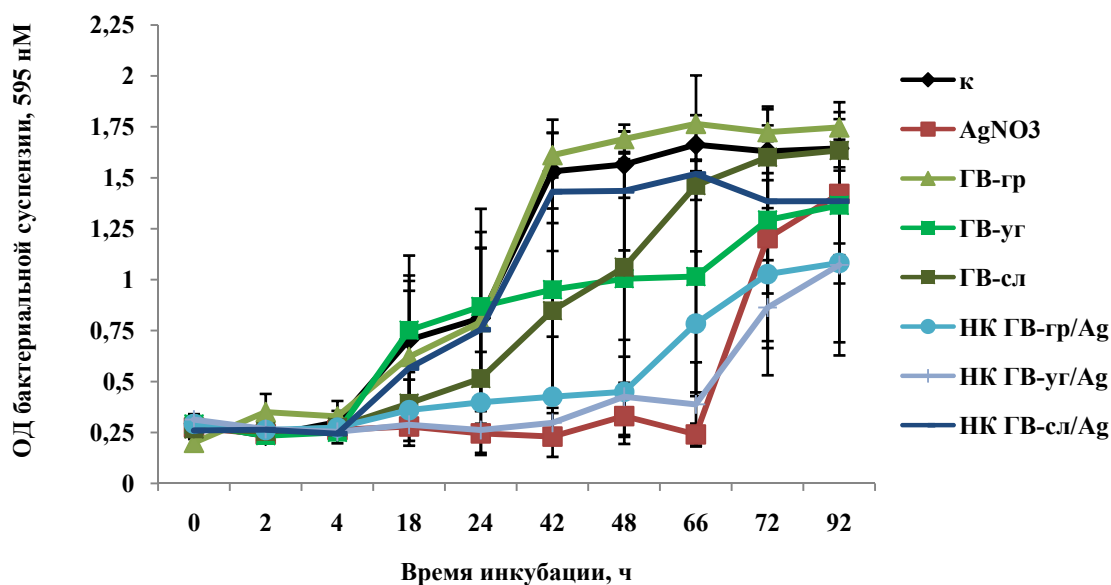


Рис. 1. Влияние нанокompозитов серебра на основе гуминовых веществ и их предшественников на оптическую плотность (К – контроль; AgNO₃ – нитрат серебра; Гв–гр – гуминовые вещества на основе грязей; Гв–уг – гуминовые вещества на основе углей; Гв–сл – гуминовые вещества на основе сланцев; НКГв–гр/AgNO₃ – нанокompозит серебра с гуминовыми веществами на основе грязей; НКГв–уг/AgNO₃ – нанокompозит серебра с гуминовыми веществами на основе углей; НКГв–сл/AgNO₃ – нанокompозит серебра с гуминовыми веществами на основе сланцев).

Данные по исследованиям оптической плотности показывают, что нитрат серебра ингибирует рост бактерий, так же, как и нанокompозиты серебра с гуминовыми веществами на основе углей и грязей, тем самым проявляют повышенный бактерицидный эффект. Все остальные вещества стимулируют рост. А также проводились исследования их биопленкообразования, которое проводилось по следующей схеме: бактериальной суспензии с НК и его предшественниками, заранее профильтрованные с помощью фильтра 0,22 мкм, раскапывали в условиях бокса на стерильный 96-луночный планшет по 200 мкл против чистой среды. Стерильный планшет

убирали в темноту на 2 сут. Через 48 часов из лунок планшета удаляли суспензию и окрашивали пленки, образовавшиеся на дне. Для этого в каждую лунку аккуратно (не взбалтывая) вносили 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% кристаллвиолета и инкубировали в течении 45 минут при комнатной температуре. После тщательного промывая дистиллированной водой (аккуратно не попадая в лунки) для экстракции краски из пленки добавляли 200 мкл 96% этанола и измеряли оптическую плотность этого раствора при длине волны 595 нм. Интенсивность окраски содержимого лунок свидетельствовала о степени пленкообразования (рис. 2).

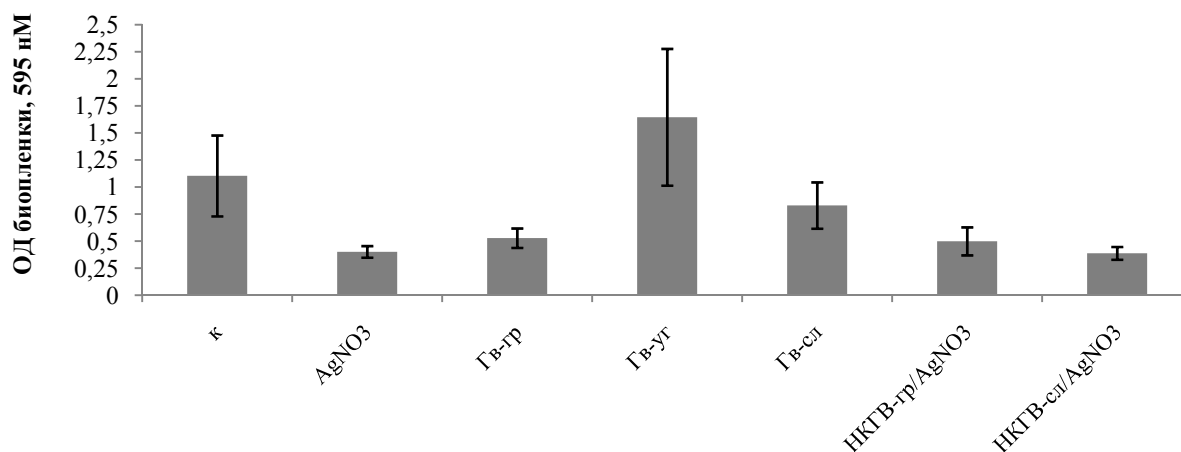


Рис. 2. Образование биопленок под действием наноконпозитов и его предшественников (обозначения как на рис. 1).

Данные по образованию биопленок показывают, что Гв – угли и НКГв – уг/AgNO₃ стимулируют рост биопленкообразования, противно как AgNO₃, Гв –грязи, НКГв – гр/AgNO₃, НКГв – сл/AgNO₃ ингибируют рост биопленок, что лишний раз доказывает их высокий бактерицидный эффект. Полученный результат о влиянии наноконпозитов на биопленкообразование *Stm* является чрезвычайно важным, так как известно, что исследуемая бактерия способна образовывать биопленки внутри стебля приводя к закупорке сосудов растений, что вызывает вилт и пожелтение листьев у них.

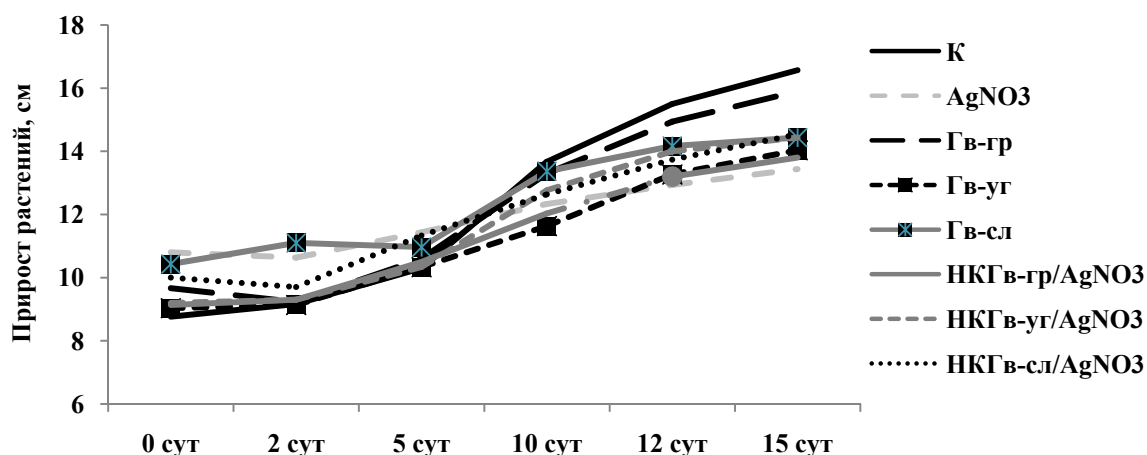


Рис. 3. Влияние наноконпозитов серебра в различных матрицах, а также их предшественников на прирост картофеля *in vitro* по сравнению с контролем (обозначения как на рис. 1).

Растения для эксперимента выращивали в факторостатных условиях (при температуре 23-25 °С днем и 18- 20 °С – ночью, влажность – 75-85 %, освещенность – 5000-7000 лк при 16-часовом световом дне) в течение 14 суток. Далее их пересаживали на жидкую среду (питательная среда для растений Мурасиге-Скуга) без агара. На растениях проводились исследования по влиянию НК и его предшественников на прирост и количество листьев, добавляя в них по 1 мл растворенных веществ. Через каждые 2 дня производили замеры прироста (рис. 3) и количества листьев (рис. 4), визуально анализировали пигментацию листьев, а также исследовали активность пероксидазы, как показатель устойчивости к патогену. Активность пероксидазы мерили при помощи спектрофотометра с добавлением перекиси водорода (рис. 5).

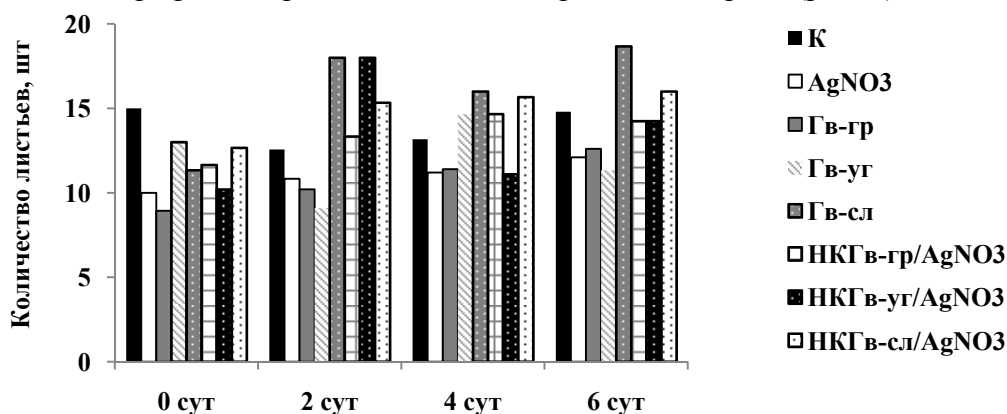


Рис. 4. Влияние нанокмпозитов серебра в различных матрицах, а также их предшественников на количество листьев картофеля *in vitro* по сравнению с контролем (обозначения как на рис. 1).

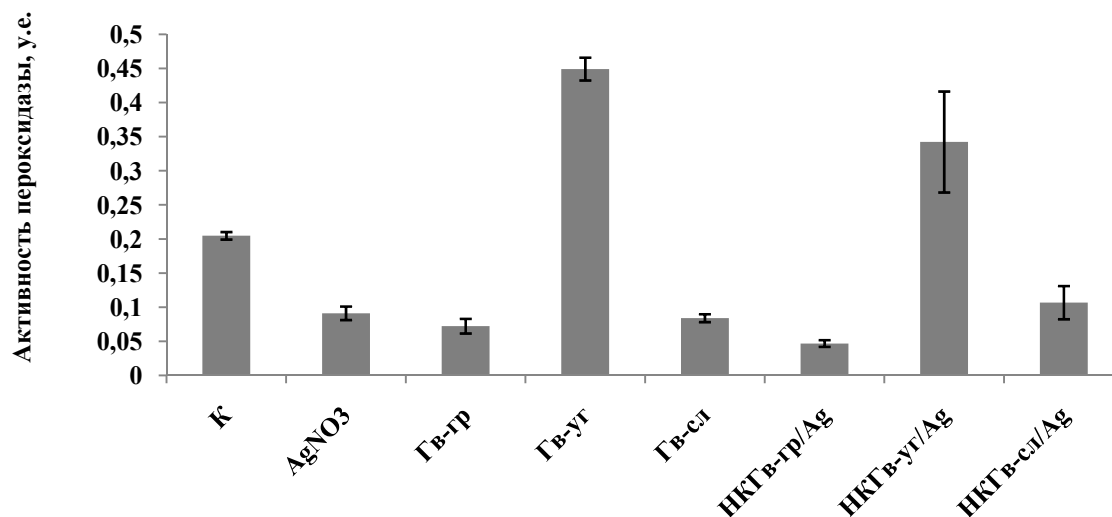


Рис. 5. Влияние нанокмпозитов серебра в различных матрицах, а также их предшественников на активность пероксидазы в тканях картофеля *in vitro* по сравнению с контролем (обозначения как на рис. 1).

Результаты показали, что AgNO₃ негативно влиял на оба исследуемых показателя. Гв - гр значительно подавляют активность пероксидазы, не влияет на прирост растений, при этом снижая количество листьев на них. Гв - уг в 2 раза по сравнению с контролем стимулируют активность пероксидазы, при этом снижают прирост растений и количество листьев. Это свидетельствует о негативном влиянии углей на картофель, наличии стрессового состояния. Гв - сл ингибирует активность фермента, на прирост

растений в начале периода наблюдения не оказывало влияние, за тем снижало, при этом стимулирование образование листьев у картофеля. Наноккомпозит на основе пеллоидов НКГв - гр/AgNO₃ характеризовался низкой активностью пероксидазы по сравнению с контролем, небольшим снижением прироста растений, количество листьев было на уровне контроля. Обработка картофеля НКГв - уг/AgNO₃ приводила к повышению активности фермента в 2 раза, прирост растений снижался по сравнению с контролем, количество листьев было как у необработанных растений. Наноккомпозит на основе сланцев НКГв - сл/AgNO₃ незначительно понижал активность пероксидазы картофеля, пророст растений несколько снижался, однако стимулировалось образование листьев по сравнению с контрольными растениями.

Обобщая полученные данные, можно предположить, что действие наноккомпозитов на основе гуминовых веществ различной природы и их предшественники является антибактериальным. Имеющиеся графики подтверждают, что НКГв – сл/AgNO₃ и НКГв – уг/AgNO₃ проявляют повышенную антибактериальную активность по отношению к возбудителю кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum*, так же как и нитрат серебра. Ингибируют у бактерий пленкообразование и их рост. НКГв – уг/AgNO₃ и его предшественник Гв – уг проявили повышенный бактериальный эффект и стимулировали рост растений, поэтому на основе данных исследований можно предположит, что наноккомпозиты на основе углей самые эффективные, экологически безопасные вещества для борьбы с фитопатогеном картофеля. Поэтому можно утверждать, что использование наноккомпозитов на основе гуминовых веществ является эффективным средством для обработки растений против бактериальных заболеваний.

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

Литература

Граскова И.А., Перфильева А.И., Арсентьев К.Ю., Клименков И.В., Мотылева С.М., Войников В. К. Характеристика штамма AC-1405 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, вызывающего кольцевую гниль картофеля // Агрохимия. – 2018. – № 3 – С. 73.

Омельченко А.В., Юркова И. Н., Жижина М.Н. Стимулирующее действие наночастиц серебра на рост и развитие растений пшеницы // Ученые записи Таврического национального университета им. В. И. Вернадского – серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27, № 1. – С. 127–135.

Eichenlaub R., Gartemann K.H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // Annu. Rev. Phytopathol. – 2011. – V. 49. – P. 445–64.

Van der Wolf J. M., Elphinstone J. G., Stead D. E., Metzler M., Muller P., Hukkanen A., Karjalainen R. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot // Plant Research International B.V. Wageningen, February 2005. – Report 95.

**STUDYING ANTIBACTERIAL EFFECT OF SILVER NANOCOMPOSITES
ON THE BASIS OF HUMIN SUBSTANCES AND PRECURSORS SUBSTANCES IS
THEIR AGAINST THE EXCITANT RING ROT OF THE POTETO**

O.A. Nozhkina¹, A. I. Perfilyeva¹, I. A. Graskova¹, A. V. Sidorov¹, B. G. Sukhov²

¹Siberian institute of physiology and biochemistry of plant of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk, Russia

²Irkutsk institute of chemistry of Favorskii of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk, Russia, *smallolga@mail.ru*

Abstract. In work the researches directed to studying of nanoparticles of silver which were packed in various matrixes of humic substances natural origin for processing of plants against phytopathogens were conducted. Experimentally were shown antibacterial properties of some nanocomposites, and their predecessors. Substances inhibit growth of bacteria and their ability to biofilm formation, at the same time without doing harm to plants.

Keywords: *nanocomposites, nanoparticles of silver, antibacterial properties, humic substances*