

ORIGINAL ARTICLE

Growth Behavior of Phytopathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* Treated with Selenium Biocomposites of Mushroom Origin

A.I. Perfileva^{1*}, O.M. Tsivileva², O.V. Koftin²

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

² Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, Saratov, Russia

*E-Mail: alla.light@mail.ru

Received November 26, 2015

The results of studying the effect of biologically obtained selenium nanocomposites on the bacterium *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) are presented. *Cms* is a Gram-positive bacterium, which causes one of the most dangerous potato diseases, ring rot. The effective alongside ecologically safe methods for combating *Cms* are lacking. As the agents feasible for use in this purpose, we examined the selenium nanocomposites obtained from the macrobasidiomycetes' submerged cultures. For exploring the bionanocomposites effect on *Cms*, the methods of agar well diffusion, the suspension turbidity measurement, and the colony-forming units count were applied. The results showed that all the nanocomposites under study lowered the bacterial suspension's absorption values compared to the reference specimen, that testified to the observation of bacteriostatic effect of the agents tested. The suppression action of nanocomposites was elucidated by means of both agar well diffusion assay and colony-forming units count. Thus, the results obtained demonstrate the occurrence of bacteriostatic and bactericidal effects of the substances under study, and favor the supposition on advisability of further research into the selenium nanocomposites as the agents for agricultural recovery from the bacterial pathogens.

Key words: *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*, antibacterial activity, biocomposites, mushrooms, selenium

Инфекции картофеля (*Solanum tuberosum*), одной из важнейших пищевых культур мирового значения, приводят к потерям, достигающим 65 млн. тонн (16 млрд долларов) ежегодно (Shabuer *et al.*, 2015). Широко распространенное заболевание кольцевая гниль картофеля вызывается грамположительной бактерией - *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*). Эффективные методы регуляции численности этого фитопатогена отсутствуют, а все имеющиеся способы являются профилактическими и сводятся к обеззараживанию тары, инвентаря и посадочного материала агрессивными агентами (раствор формальдегида, пероксид водорода, соляная кислота и др.) (Secor *et al.*, 1988). Представляется перспективным связать разработку эффективных и безопасных способов оздоровления картофеля от *Cms* с применением препаратов на основе природных соединений.

В настоящее время природные полимеры широко используются для получения новых композитных материалов разнообразного назначения, имея минимальные экологические последствия (Волкова, 2015). Базидиальные культивируемые грибы рассматриваются как перспективное экологически чистое сырье для создания разнообразных препаратов широкого спектра действия. Внимание исследователей привлекают олиго- и полисахариды грибного происхождения благодаря их доступности, биосовместимости, доказанной биологической активности, в том числе антибактериальным

свойствам. Особый интерес представляют гибридные органо-неорганические биоконпозиты потенциально антимикробного элементного селена (Khiralla and El-Deeb, 2015), получаемые на основе внеклеточных метаболитов лекарственных базидиомицетов (Tsymbal *et al.*, 2015).

В настоящей работе мы исследовали антибактериальную активность гибридных органо-неорганических биоконпозитов селена в отношении кольцевой гнили картофеля.

MATERIALS AND METHODS

Использовали штамм Ас 1405 возбудителя кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Cms* (получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пущино, Московская обл.). Бактериальную культуру выращивали в темноте при 26°C на качалке (80 об./мин) в колбах, содержащих жидкую питательную среду YPGA, содержащую: пептон («Биотехновация», Россия) – 10 г/л, дрожжевой гидролизат («Sigma», США) – 5 г/л, CaCO₃ («Реахим», Россия) - 5 г/л, глюкозу («Реахим», Россия) – 5 г/л, pH 7.2. В настоящей работе были использованы три методики: метод диффузии в агар (анализ размеров зон ингибирования), определение плотности бактериальной суспензии и высевы для определения КОЕ. Выбор методик обоснован возможностью выявления с их помощью бактериостатического и бактерицидного эффекта исследуемых агентов.

Для исследования эффекта биоконпозитов на бактерии по методу диффузии в агар (Sagdic *et al.*,

2006) в агаризованной среде YPGA стерильным пробойником (диаметр 6 мм) были сделаны лунки, в которые вносили 150 мкл биокомпозита, затем на среду наносилась бактериальная суспензия *Cms*. Спустя 4 суток инкубации влияние биокомпозитов определяли по наличию и величине зоны ингибирования вокруг лунки.

Исследование влияния биокомпозитов на плотность бактериальной суспензии проводили путем измерения оптического поглощения бактериальной суспензии после добавления нанокомпозитов. Оптическую плотность (OD) бактериальной суспензии измеряли через 0, 2, 6, 24, 32 и 50 ч с момента посева *Cms* и внесения биокомпозитов (в количестве 1 мл на 20 мл среды). Оптическую плотность фиксировали при 595 нм на планшетном спектрофотометре фирмы BIO-RAD model 680 (США).

Наличие бактерицидного эффекта у исследуемых агентов выявляли с помощью высевов бактериальной суспензии, инкубируемой сутки с биокомпозитом, на агаризованную среду. Подсчет колоний производили спустя 4 суток инкубации.

Полученные результаты были статистически обработаны с использованием пакета программ Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

В связи с сохраняющейся необходимостью поиска новых антимикробных препаратов синтетические селеноорганические соединения (Chan et al., 2007; Pietka-Ottlik et al., 2008; Rusetskaya and Borodulin, 2013) и биологически

активный красный селен являются перспективными объектами исследования. Скрининг биопродуктов более активных и менее токсичных антибактериальных субстанций продолжается, в том числе среди ксилотрофных базидиомицетов, которые являются одними из наиболее биотехнологически ценных высших грибов съедобных и/или лекарственных видов, источников антимикробных соединений (De S. Pereira et al., 2013). Актуальны разработки методологий извлечения и характеристики таких субстанций грибного происхождения.

Нами установлено, что образцы мицелиальной суспензии на основе *Ganoderma applanatum* с элементарным красным селеном, полученным биовосстановлением из нетоксичной селеноорганической формы с помощью метаболитов гриба, проявляли бактерицидный эффект в отношении *Staphylococcus aureus* (Tsivileva et al., 2015). Указанная активность в тех же экспериментальных условиях у мицелиальных образцов, выращенных без добавок соединения-источника селена, как и у самих добавок, отсутствовала. В настоящей работе нами изучена антибактериальная активность Se-содержащих биокомпозитов, полученных на основе культур грибов родов *Ganoderma*, *Grifola*, *Laetiporus*, *Lentinula*, *Pleurotus*, в отношении возбудителя кольцевой гнили картофеля.

При добавлении Se-биополимерных композиций в питательные среды *Cms* наблюдали ухудшение роста бактерий (рис. 1).

Установлено определяющее влияние селенового компонента биополимерных композитов на изучаемую биологическую активность. Условия образования полимерных компонентов Se-содержащих и Se-несодержащих грибных субстанций унифицированы по физико-химическим параметрам культивирования; предшествующего процедуре выделения композитов. Использовали посевной глубинный мицелий одной исходной культуры каждого штамма. При этом Se-композиты, в сравнении с биополимерными субстанциями, полученными из того же гриба, обладали несравненно более выраженным антибактериальным эффектом (рис. 1).

Обнаружена зависимость антимикробного действия селенсодержащих опытных образцов от биологического вида гриба, глубинную культуру которого использовали для получения этих образцов. Максимальной активностью обладали биокомпозиты на основе внеклеточных метаболитов *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*. Следует отметить очень умеренную способность угнетения роста тест-микроорганизма, выявленную при использовании биокомпозита на основе *Laetiporus sulphureus* (HK5). Трутовик серно-желтый - гриб бурой гнили, в отличие от остальных макробазидиомицетов - грибов белой гнили, вовлеченных в наш эксперимент. Вполне возможно, что принадлежность к данной экологической подгруппе ксилотрофов и связанные с этим биохимические особенности *L. sulphureus*

проявляются в аспекте противомикробного действия в отношении *Cms*.

Для сравнительной оценки антимикробной активности полимерных композиций грибного происхождения нами был использован метод диффузии в агар (способ цилиндрических лунок, «колодцев») по отношению к *Cms* как тест-культуре. Оценка результатов проводили по радиусу зон задержки роста *Cms* вокруг лунки, не учитывая диаметр самого цилиндра. Ширину зон ингибирования измеряли с помощью миллиметровой бумаги. В некоторых опытах зоны угнетения имели овальную форму, - в таких случаях измеряли наибольший и наименьший радиусы зоны и вычисляли среднюю величину, которая и принималась за показатель.

Результаты исследования методом диффузии в агар представлены на рис. 2.

Определение чувствительности фитопатогена к биокомпозитам также проводили, используя метод измерения оптического поглощения бактериальных суспензий. Полученные данные отражены на рис. 3.

Из представленных данных видно, что композиты на основе биополимеров грибов различаются по степени выраженности бактерицидного действия в отношении кольцевой гнили картофеля, прежде всего в зависимости от уровня селена в составе композита. Ясно, что само по себе увеличение массовой доли Se не приводит у усилению эффекта. Биокомпозит на основе *Grifola umbellata* (HK2) характеризуется

максимальным уровнем Se, но не максимальной в эксперименте способностью подавлять *Cms*. Несколько меньше по сравнению с НК2 относительное содержание Se имеет место в композитах на основе *Pleurotus ostreatus* (НК3), *Lentinula edodes* (НК4), *Laetiporus sulphureus*

(НК5). Однако при равных величинах массовой доли Se в композитах НК3, НК4 и НК5 антимикробная активность выше в НК4, что связано, по-видимому, с особенностями внеклеточных метаболитов гриба шиитаке (*L. edodes*) (рис. 2).

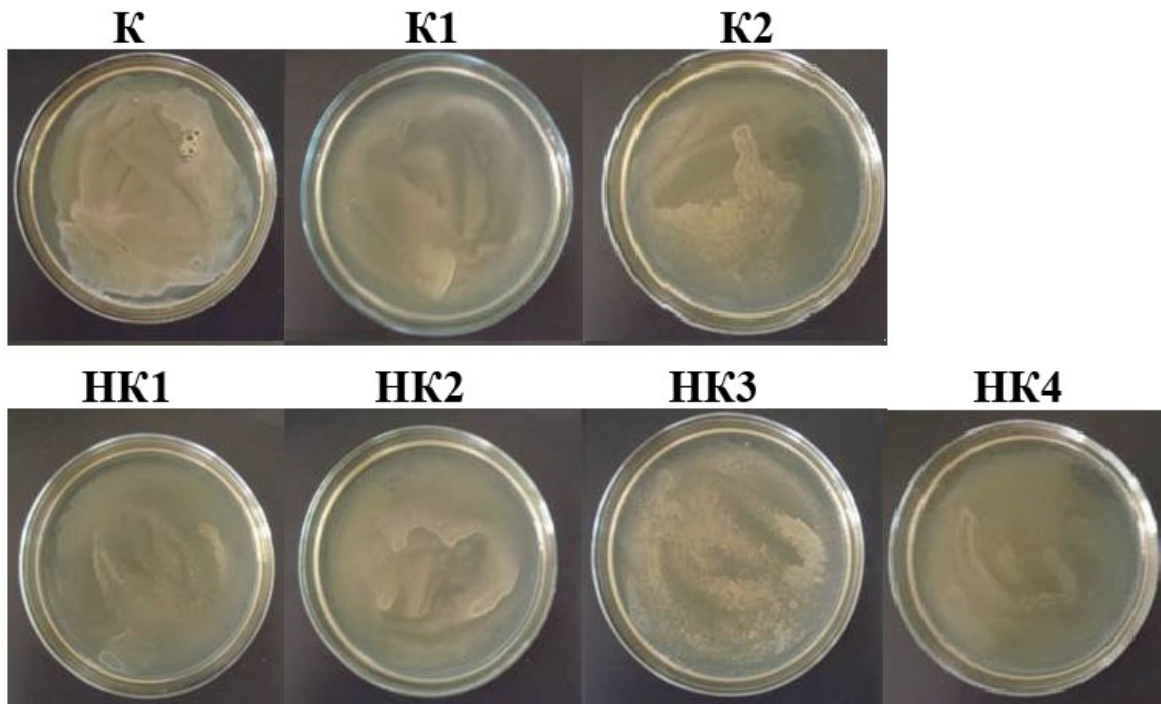


Figure 1. Рост *Cms* на агаризованных средах в присутствии нанокompозитов селена

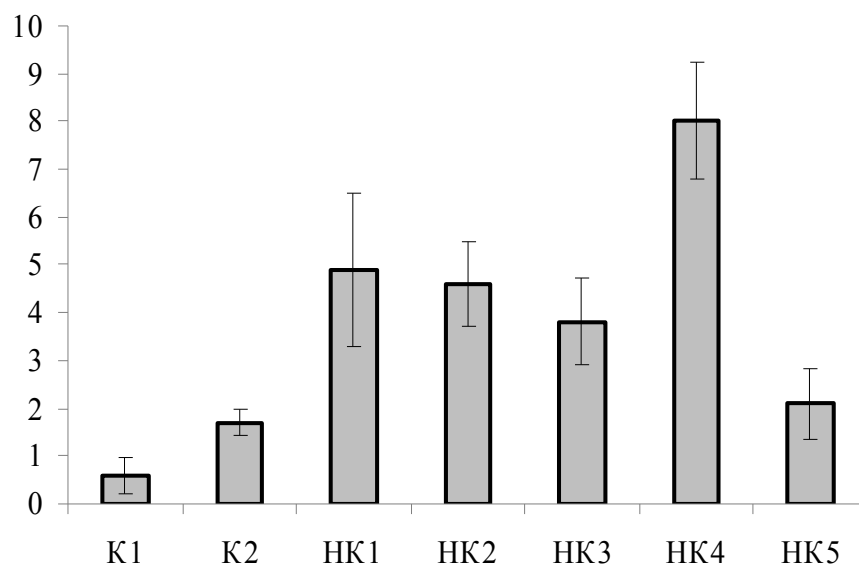


Figure 2. Влияние нанокompозитов селена на *Cms* (метод диффузии в агар).

По оси абсцисс - условные обозначения композитов, по оси ординат - ширина зоны ингибирования, мм

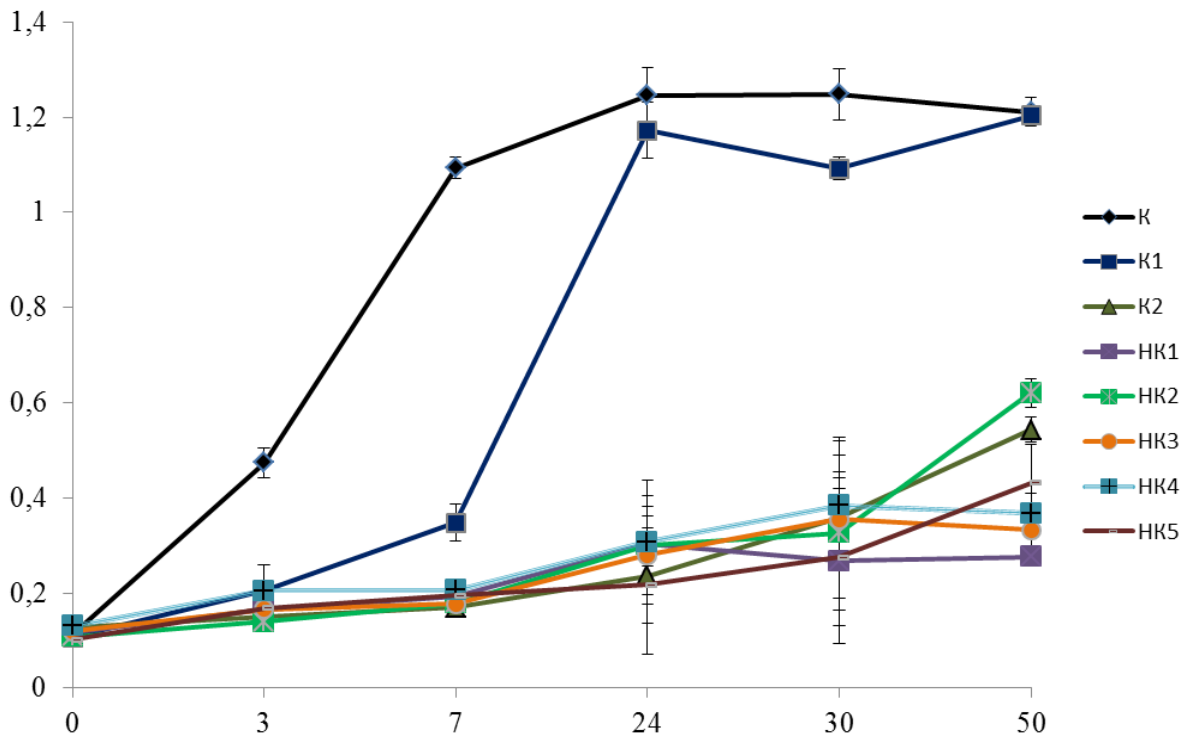


Figure 3. Влияние нанокompозитов селена на *Cms* (метод плотности суспензии).

По оси абсцисс - время инкубации, ч; по оси ординат - оптическое поглощение, λ_{595}

Получение биополимерных тестируемых субстанций K1, K2 при исключении прекурсора селена из питательных сред базидиомицетов приводит к резко сниженной способности подавлять *Cms* (рис. 2, 3). При этом особенности культуры *Ganoderma lucidum*, использованной при изготовлении K2, и НК1, по-видимому, благоприятствуют обсуждаемой биологической активности грибных изолятов в отношении *Cms* таким образом, что даже при минимальном в условиях нашего эксперимента относительном уровне селена в своем составе композит НК1 занимает промежуточное положение в аспекте проявления антибактериального действия (рис. 2).

CONCLUSIONS

Представленные результаты можно

рассматривать как первую информацию о биологической активности нанобиокompозитов элементарного селена на основе полимерных матриц внеклеточных метаболитов глубинных культур высших грибов. Выявлена бактериостатическая и бактерицидная активность исследованных субстанций в отношении фитопатогена *Cms*. Показаны видоспецифические особенности проявления антибактериального эффекта селеновых биокompозитов, полученных на основе культур разных родов и видов грибов. Изученные виды макробазидиомицетов могут служить перспективным источником антибактериальных агентов в отношении кольцевой гнили картофеля, в связи с чем мы продолжаем исследования с целью оптимизации условий культивирования продуцентов, процедур изготовления

биокомпозитов, приемов их применения.

ACKNOWLEDGMENT

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-34-51309_мол-нр).

REFERENCES

- Chan G., Hardej D., Santoro M., Lau-Cam C., Billack B. (2007) Evaluation of the antimicrobial activity of ebselen: role of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **21 (5)**, 252-264.
- De S. Pereira-Jr J.A., Rodrigues D.P., Peixoto-Filho R.C., Bastos I.V.G.A., De Oliveira G.G., Araújo J.M., Melo S.J. (2013) Contribution to Pharmacognostic and Morphoanatomical Studies, Antibacterial and Cytotoxic Activities of *Ganoderma parvulum* Murrill (Basidiomycota, Polyporales, Ganodermataceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, **32 (7)**, 996-1003.
- Eichenlaub R., Gartemann K.H. (2011) The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **49**, 445-464.
- Khiralla G.M., El-Deeb B.A. (2015) Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, **63 (2)**, 1001-1007.
- Pietka-Ottlik M, Wójtowicz-Młochowska H, Kołodziejczyk K, Piasecki E, Młochowski J. (2008) New organoselenium compounds active against pathogenic bacteria, fungi and viruses. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **56(10)**, 1423-1427.
- Rusetskaya N.Yu., Borodulin V.B. (2013) Antibacterial effect of the organoselenium compound 1,5-di-(*p*-fluorinophenyl)-3-selenopentanedione-1,5 on the clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Applied and Basic Research*, **10**, 260-262.
- Sagdic O., Aksoy A., Ozkan G. (2006) Evaluation of the antibacterial and antioxidant potentials of gilaburu (*Viburnum opulus* L.) fruit extract. *Acta Alimentaria*, **35(4)**, 487-492.
- Secor G.A., DeBuhr L., Gudmestad N.C. (1988) Susceptibility of *Corynebacterium sepedonicum* to disinfectants *in vitro*. *Plant disease*, **72(7)**, 585-588.
- Shabuer G., Ishida K., Pidot S.J., Roth M., Dahse H.M., Hertweck C. (2015) Plant pathogenic anaerobic bacteria use aromatic polyketides to access aerobic territory. *Science*, **350(6261)**, 670-674.
- Tsvileva O.M., Malyshina M.S., Tsymbal O.A., Koftin O.V. (2015) Antibacterial effect of mycelial suspensions of mushrooms grown with warfarin and organic selenide. In Shkurat T.P., Panich A.E. (eds.), *Actual problems of biology, nanotechnology and medicine*. Southern Federal University Press, Rostov-on-Don, Russia, pp. 291-292.
- Tsymbal O.A., Tsvileva O.M., Pankratov A.N., Markin A.V. (2015) Promising biomedical potential of the mushrooms mycelia enriched with selenium.

Russian Immunological Journal, **9[18](2[1])**,
767-769.

Volova T.G. (2015) Degradable
Polyhydroxyalkanoates of Microbial Origin as a

Technical Analog of Non-Degradable
Polyolefines. *Journal of Siberian Federal
University. Biology*, **8(2)**, 131-151.