

Bactericidal Influence of Silver Nanocomposites on *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Perfileva A.I.¹, Zhivet'yev M.A.¹, Gasisova A.V.¹,
Borovskii G.B.¹, Graskova I.A.^{1,2}, Sukhov B.G.³,
Trofimov B.A.³

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, PO 317, Irkutsk 664033, Lermontova St., 132, Russia

² The Irkutsk Scientific Center of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk 664033, Lermontova St., 130, Russia

³ A.E. Favorsky Irkutsk institute of Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033, 1, Favorskogo St., 1., Russia

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

Received March 16, 2016

The results of studying the effect of silver nanocomposites received by chemical synthesis 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 agent, possible for application for this purpose, we investigated silver nanocomposites. For definition of nanocomposites influence on *Cms* we applied seedings to calculation the colony-forming units, after an incubation of bacteria with a nanocomposite in the distilled water (the grown poor environment) and on a nutrient medium. Influence of silver nanocomposites on cellular respiration which was estimated on oxygen absorption speed is also investigated. Thus, the obtained results demonstrate the occurrence of bactericidal effects of the substances under study, and favor the supposition on advisability of further research into the silver nanocomposites as the agents for agricultural recovery from the bacterial pathogens.

Key words: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, antibacterial activity, nanocomposites, silver

Известно, что серебро обладает бактерицидным эффектом (Рушинская и др., 1976; Потапченко и др., 1985; Березняков, Страшный, 1997; Humberto *et al.*, 2010). Такое свойство серебра находит применение в медицине для стерилизации различных инструментов и совершенно не рассматривается для защиты культурных растений от патогенов. Существует большое количество бактериальных фитопатогенов, приводящих к значительным потерям урожая, средства борьбы с такими бактериями не эффективны. Примером такого микроорганизма является возбудитель кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* (Cms) (Eichenlaub, Gartemann, 2011). В настоящее время одним из перспективных направлений химического синтеза является создание антибактериальных препаратов на основе наночастиц серебра (Chen, Schluesener, 2008), стабилизированных природными и синтетическими полимерами. Наночастицы серебра плотно упаковываются в полисахаридную матрицу. Применение таких нанокompозитов представляется удобным и безопасным для растения, а также с помощью них осуществляется адресная доставка веществ в бактериальную клетку фитопатогена.

Цель настоящей работы - исследование влияния нанокompозита серебра на возбудитель кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum*.

MATERIALS AND METHODS

Исследования проводились на бактериях *Cms* штамм Ас 14 05, получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Москва). Бактериальную культуру

выращивали на скошенной агаризованной среде, содержащей диализат дрожжевого экстракта («Sigma», США) 10 г/л, глюкозу 15 г/л, агара-агар («Биотехновация», Россия) 10 г/л, 5 г/л CaCO₃ («Реахим», Россия), pH 7,0. Бактерии культивировали в термостате, в темноте при температуре 25°C.

В настоящей работе нами были использованы нанокompозиты (наночастицы серебра, стабилизированные арабиногалактаном), а также их предшественники (арабиногалактан и нитрат серебра), разработанные и синтезируемые в Иркутском институте органической химии им. А.Е. Фаворского СО РАН. Все нанокompозиты хорошо растворимы в воде и удобны в использовании.

Для экспериментов бактерии культивировали в физиологическом и водном растворе с добавлением следующих агентов: арабиногалактан, нанокompозит (Ag-арабиногалактан с содержанием серебра 2,9%), нанокompозит (Ag-арабиногалактан с содержанием серебра 4,7%), нитрат серебра.

Бактерии с добавленными агентами инкубировали в аэростатных условиях (качалка, 80 об./мин) при температуре 25 °С, в темноте. Спустя 1 и 6 ч после обработки производили высев бактериальной суспензии на твердую среду, через 7 суток контролировали количество колониеобразующих единиц (КОЕ, кл/10 мкл).

Для определения скорости дыхания клетками, 2-х суточные бактерии *Cms* инкубировали с нанокompозитами 6 ч в аэростатных условиях. Далее 1,4 мл суспензии клеток в среде вносили в термостатируемую полярографическую ячейку и,

используя платиновый электрод закрытого типа (электрод Кларка), на полярографе ОН-105 (Венгрия) (Трушанов, 1973) регистрировали скорость поглощения кислорода при 26 °С. Скорость поглощения кислорода выражали в нмоль поглощенного кислорода в минуту на 1000 клеток, учитывая растворимость кислорода в воде (Трушанов, 1973).

Полученные результаты были статистически обработаны с использованием пакета программ MS Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

Опыты по влиянию серебросодержащих нанокompозитов на *Cms* проводили с использованием растворов с одинаковым содержанием серебра. В качестве среды культивирования бактерий применяли дистиллированную воду и питательную среду. Время культивирования на дистилляте было выбрано 1 ч, а на питательной среде – 6 ч.

Согласно полученным результатам, спустя 1 ч культивирования *Cms* в водном растворе нитрата серебра наблюдали полную гибель бактериальных клеток (рис. 1). Также при культивировании на дистиллированной воде проявлялось токсическое действие серебросодержащих нанокompозитов, но нанокompозит с содержанием серебра 2,9% обладал слабым токсическим эффектом, в то время как Ag-арабиногалактан с содержанием серебра 4,7% вызывал уже полную гибель клеток.

При культивировании *Cms* на питательной среде в присутствии действующих веществ не наблюдалось

токсического действия обоих нанокompозитов (рис. 2).

Нитрат серебра на питательной среде оказывал токсический эффект, но он был несколько ниже, чем в эксперименте с культивированием патогена на дистилляте (рис. 1).

Таким образом, при культивировании *Cms* на питательной среде токсический эффект нанокompозитов не наблюдался, но при культивировании на обедненной среде (дистиллированная вода) их токсичность была хорошо заметна. Это объясняется тем, что на обедненной питательной среде отсутствовали источники углеводов и бактерии активно поглощали нанокompозиты, состоящие из арабиногалактановой оболочки. В результате чего, наночастицы серебра также проникали в бактериальные клетки, вызывая их гибель. В питательной среде в качестве источника углеводов имеется глюкоза, которая легкодоступна для бактерий, поэтому *Cms* в меньшей степени поглощали нанокompозиты.

Для выявления механизма подавления нанокompозитами серебра бактерий нами было изучено изменение интенсивности поглощения кислорода клетками *Cms* после обработки нанокompозитами. Полученные результаты представлены на рис. 3. Показано, что углеродный предшественник нанокompозитов – арабиногалактан несколько стимулировал поглощение кислорода клетками. Выявлен подавляющий эффект на дыхание у нанокompозита с содержанием серебра 4,7% и предшественника нанокompозита – нитрата серебра.

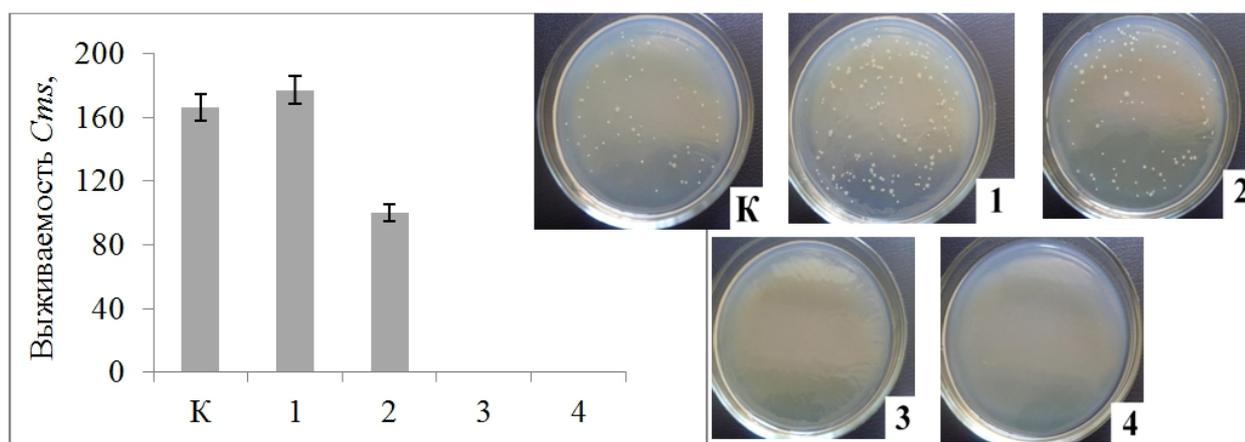


Figure 1. Колониеобразующая способность бактериального патогена после обработки (1 час) водными растворами нанокомпозитов и их предшественников в дистиллированной воде, с концентрацией действующего вещества 0,00145% (в пересчёте на элементарное серебро), титр бактерий $3 \cdot 10^8$ кл/мл, разведение 10^{-6} .

К – контроль, 1 – арабиногалактан, 2 – Ag-арабиногалактан с содержанием серебра 2,9%, 3 – Ag-арабиногалактан с содержанием серебра 4,7% , 4 – нитрат серебра.

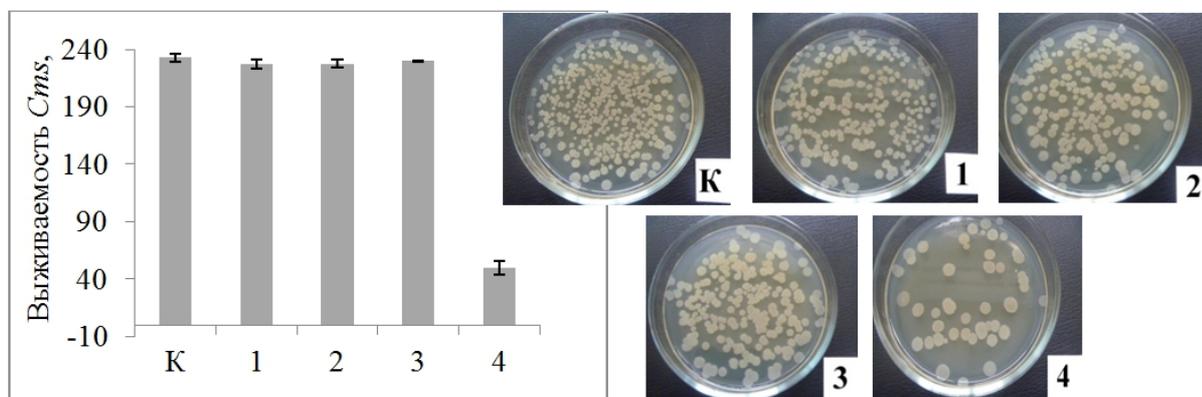


Figure 2. Колониеобразующая способность *Cms* после шестичасовой обработки водными растворами нанокомпозитов и их предшественников в питательной среде, содержащими 0,00145% серебра (в пересчёте на элементарное серебро), титр бактерий $1,8 \cdot 10^8$ клеток/мл, разведение 10^{-6} .

К – контроль, 1 – арабиногалактан, 2 – Ag-арабиногалактан с содержанием серебра 2,9%, 3 – Ag-арабиногалактан с содержанием серебра 4,7% , 4 – нитрат серебра.

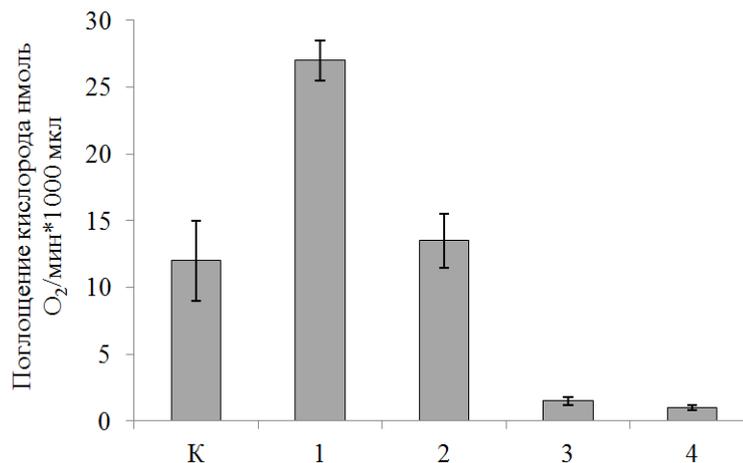


Figure 3. Колониеобразующая способность бактериального патогена после обработки (1 час) водными растворами нанокompозитов и их предшественников в дистиллированной воде, с концентрацией действующего вещества 0,00145% (в пересчёте на элементарное серебро), титр бактерий $3 \cdot 10^8$ кл/мл, разведение 10^{-6} .

К – контроль, 1 – арабиногалактан, 2 – Ag-арабиногалактан с содержанием серебра 2,9%, 3 – Ag-арабиногалактан с содержанием серебра 4,7% , 4 – нитрат серебра.

Обобщая полученные данные, можно сделать заключение, что при выращивании *Stms* на бедной среде (дистиллированная вода) проявляется высокий уровень токсичности нанобиокompозитов, что связано с активным поглощением бактериальными клетками арабиногалактана, из которого после расщепления и усвоения полисахарида высвобождается действующий агент и убивает клетки. Эта гипотеза подтверждается тем, что при выращивании на богатой питательной среде бактерицидное действие нанокompозитов уменьшается. Проведенные исследования позволяют предполагать, что снижение КОЕ *Stms* после обработки нанокompозитами может быть связано с подавлением дыхания бактерий. Таким образом, подтверждается функциональная роль прикрепления серебра на арабиногалактановый носитель с целью более успешной доставки агента в бактериальную клетку.

ACKNOWLEDGMENT

Авторы выражают благодарность за участие в получении результатов научному сотруднику лаб. физиологической генетики СИФИБР СО РАН к.б.н. Ирине Викторовне Любушкиной.

REFERENCES

- Березняков И.Г., Страшный В.В. (1997) Антибактериальные средства: стратегия клинического применения. Харьков: Константа, 200 с.
- Потапченко Н.Г., Славук О.С., Кульский Л.А. (1985) Кинетика подавления роста *Escherichia coli* серебром. *Микробиология*. (4), 23–26.
- Рушинская Н.Ф., Буссель Л.Г., Миразизов К.Д., Буссель А.Г. (1976) Лечение больных острым и хроническим тонзиллитом препаратами ионизированного серебра. *Здоровье*. (6), 23–25.
- Трушанов В.Н. (1973) Руководство по изучению

- биологического окисления поляграфическим методом. М.: Наука, 221 с.
- Chen X., Schluesener H.J. (2008) Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Letter.* **176(1)**, 1–12.
- Eichenlaub R., Gartemann K.H. (2011) The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**, 445–64.
- Humberto H.L., Nilda V.A., Liliana del Carmen I.T., Rodriguez P.C. (2010) Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* **26**, 615–621.