

Л.П. БАБЕНКО, Л.А. ДАНКЕВИЧ, Н.М. ЖОЛОБАК, В.В. КРУТЬ, Н.О. ЛЕОНОВА,
О.А. ДЕМЧЕНКО, М.Я. СПИВАК, В.П. ПАТИКА

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ГСП, Д03680

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ НА РІЗНІ ФІЗІОЛОГІЧНІ ГРУПИ МІКРООРГАНІЗМІВ

Досліджено вплив різних концентрацій наночастинок діоксиду церію (НДЦ) та комплексів на їх основі на ріст окремих штамів фітопатогенних та повільнорослих симбіотичних бактерій. Показано, що проти окремих штамів фітопатогенних бактерій найбільш ефективними є НДЦ в концентрації 1 мМ і 10 мМ або композиції НДЦ та екзометаболітів *Bacillus thuringiensis*. Виявлено, що жодна з досліджених концентрацій НДЦ майже не впливає на ріст симбіотичних азотфіксувальних бактерій *Bradyrhizobium japonicum*.

Ключові слова: наночастинки діоксиду церію, фітопатогенні бактерії, екзометаболіти *Bacillus thuringiensis*, *Bradyrhizobium japonicum*

На думку багатьох експертів у XXI столітті нанотехнології будуть активно розвиватися. Нанобіоматеріали в цілому і наночастинок зокрема можуть використовуватися в медицині для діагностики та лікування захворювань. Наночастинок багатьох металів проявляють антисептичну, антивірусну та антибактеріальну дію відносно збудників ряду захворювань [1, 3, 6].

В останні роки все більшої популярності набуває використання наночастинок у сільському господарстві [5]. Зокрема, наночастинок, беручи участь у процесах перенесення електронів, посилюють дію ферментів, що перетворюють нітрати в амонійний азот, інтенсифікують дихання клітин, фотосинтез, синтез ферментів і амінокислот, вуглеводний і азотний обмін, і, як наслідок, безпосередньо впливають на мінеральне живлення рослин. Так, наночастинок міді, заліза, цинку і срібла характеризуються бактерицидними властивостями, доповнюють і посилюють дію традиційних засобів захисту рослин [5].

Необхідно зазначити, що до нанокристалічних матеріалів з широким спектром дії відносяться і нанобіоматеріали на основі діоксиду церію. Незважаючи на значний інтерес, біологічна активність діоксиду церію вивчена недостатньо. До недавнього часу, даній сполуці практично не приділяли уваги, оскільки діоксид церію нерозчинний у воді та біологічних рідинах. У зв'язку з цим, особливий інтерес викликають повідомлення про перспективи застосування діоксиду церію в нанокристалічному стані, що з'явилися в останні 5 років. Завдяки кисневій нестехіометрії і низькій токсичності наночастинок діоксиду церію (НДЦ) є надзвичайно перспективним об'єктом для біологічних досліджень [1, 4].

Метою наших досліджень було вивчення впливу золю НДЦ та його композицій з екзометаболітами штаму *B. thuringiensis*. на ріст фітопатогенних і повільнорослих симбіотичних азотфіксувальних бактерій.

Матеріал і методи досліджень

Синтезовані, як описано [6], наночастинок діоксиду церію, стабілізовані цитратом (НДЦ) були досліджені щодо їх здатності впливати на ріст тест-культур фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Pectobacterium carotovum* subsp. *carotovum* УКМ В-1075^T, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂ і *Agrobacterium tumefaciens* УКМ В-1000. Також вивчено дію НДЦ на колекційний штам *Bacillus thuringiensis* 0293 та еталонний штам *B. thuringiensis* 98, що складає основу препарату Бітоксикацилін. Крім того, вивчено вплив даних наночастинок на повільнорослі симбіотичні азотфіксувальні бактерії *Bradyrhizobium japonicum* з різною активністю: високоефективний колекційний штам *B. japonicum* УКМ В-6018, що входить до складу інокулянтів для обробки насіння сої (Ризобін, Ековітал) та неефективний штам *B. japonicum* 604к.

Для визначення антагоністичної дії НДЦ на фітопатогенні бактерії та ризобії сої, мікроорганізми культивували на поживних середовищах з подальшим відмиванням і ресуспендуванням у фізіологічному розчині. Концентрацію мікроорганізмів доводили до $1 \cdot 10^4$ клітин/мл і додавали до пробірок з мікробною суспензією необхідний обсяг золю для отримання кінцевої концентрації НДЦ в пробірці 10, 1, 0,1 мМ. У якості контролю використовували суспензію мікроорганізмів аналогічної концентрації у фізіологічному розчині без додавання одного з препаратів. Всі пробірки витримували в термостаті за температури 28°C з наступним висівом на чашки Петрі через 1, 3, 6, 12 і 24 години та наступним підрахунком колоній. Для проведення даних досліджень штами *B. japonicum* культивували на колбах об'ємом 750 мл на качалці (220 об/хв.) при $26-28^{\circ}\text{C}$ та рН 6,6-7,0 протягом 72-96 год. у рідкому поживному манітно-дріжджовому середовищі. Фітопатогенні бактерії вирощували протягом 24-48 годин на картопляному агарі. Штами *B. thuringiensis* культивували за аналогічних умов у рідкому синтетичному середовищі Омелянського з додаванням 2,5% глюкози протягом 72 год. Для отримання фільтратів культуральних рідин штамів *B. thuringiensis* суспензії центрифугували за 6-8 тис./об. протягом 15 хв. Для забезпечення стерильності надосадову рідину пропускали через фільтри (діаметр пор 0,45 мкм).

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті проведених досліджень показано, що введення НДЦ в середовище росту фітопатогенних бактерій може викликати як пригнічення, так і симуляцію їх росту. Зокрема, нами показано, що всі досліджені концентрації НДЦ стимулювали ріст *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T і *P. fluorescens* 8573 (рис. 1а і 1б).

Імовірно, даний ефект може бути обумовлений здатністю патогенних для рослин представників роду *Pseudomonas* засвоювати цитрат, що є стабілізатором НДЦ, в якості додаткового джерела живлення [1]. У той же час, різні концентрації НДЦ пригнічували ріст штамів *P. carotovum* subsp. *carotovum* УКМ В-1075^T, *X. campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂ і *A. tumefaciens* УКМ В-1000 (рис. 2а, 2б, рис. 3а, 3б).

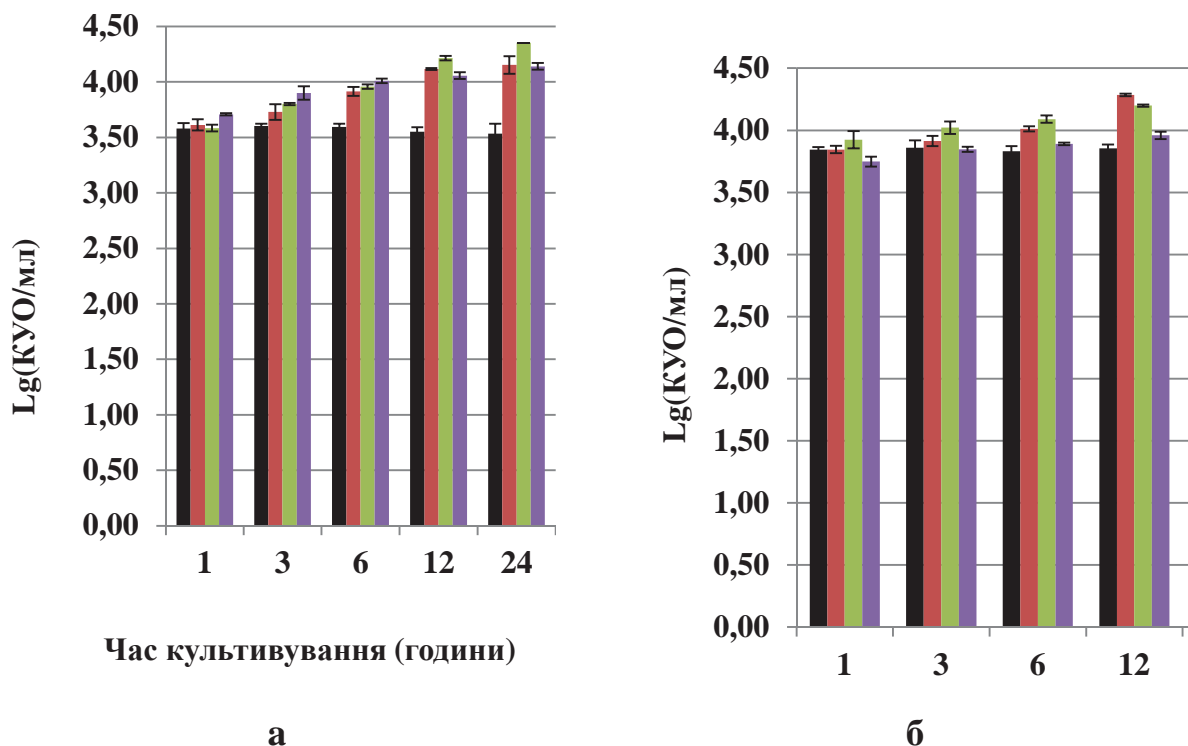


Рис. 1. Вплив різних концентрацій НДЦ на ріст патогенних для рослин бактерій роду *Pseudomonas*. (а – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T, б – *Pseudomonas fluorescens* 8573).

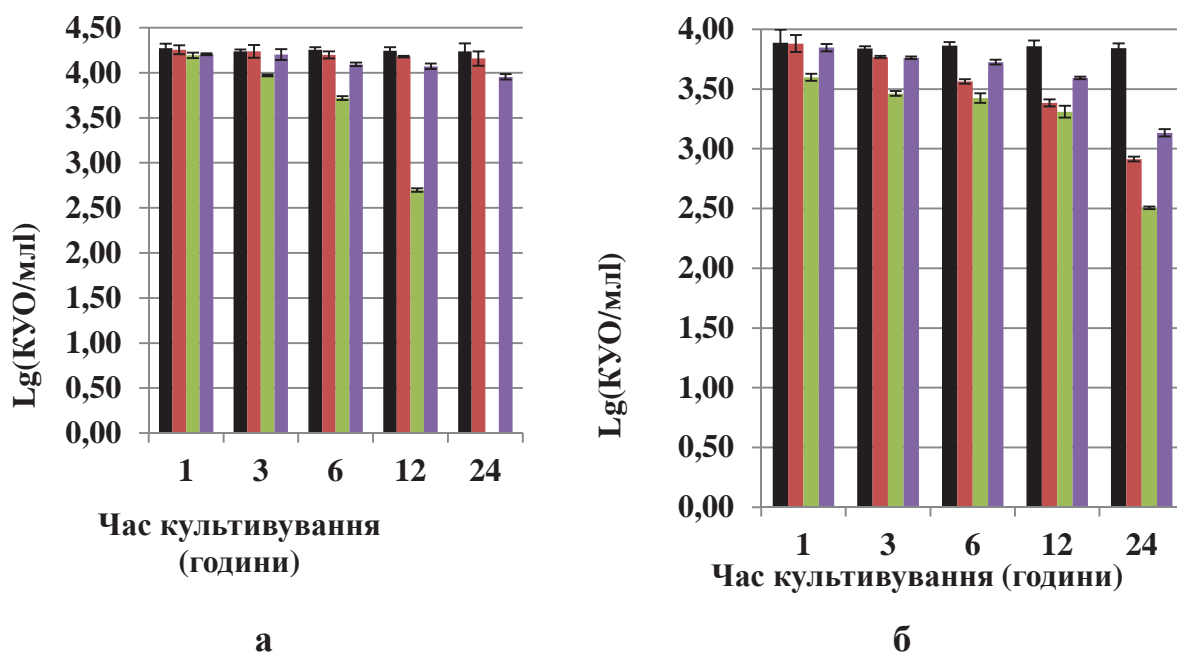


Рис. 2. Вплив різних концентрацій НДЦ на ріст фітопатогенних бактерій. (а – *Pectobacterium carotovum* subsp. *carotovum* УКМ В-1075^Т, б – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049).

Так, 1 мМ концентрація НДЦ пригнічувала ріст збудника м'яких гнилей рослин [1] – *P. carotovum* subsp. *carotovum* УКМ В-1075^Т вже на 3 год. культивування з подальшим збільшенням ефекту на 6 і 12 год. та повною зупинкою росту на 24 год. культивування (рис. 2а). Дана концентрація також негативно впливала на ріст збудника судинного бактеріозу широкого кола рослин – *X. campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049. Причому, пригнічення росту цього фітопатогена під впливом 1 мМ НДЦ спостерігалось вже на першу годину культивування, з подальшим наростанням ефекту і повною зупинкою росту на 24 год. культивування. Крім того, встановлена бактерицидна дія 10 мМ золю НДЦ на *X. campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049 вже на 6 год. культивування (рис. 2б).

Але, найбільш дієво концентрації (10 мМ, 1 мМ і 0,1 мМ) НДЦ пригнічували ріст і розвиток збудника бактеріального раку томатів – *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂. Так, статистично достовірне інгібування росту даного патогена під впливом 1 мМ і 10 мМ НДЦ спостерігалось вже на 3 год. культивування, а повна зупинка росту на 12 год. (1 мМ НДЦ) (рис. 3а). Ефективною в даному випадку виявилася 0,1 мМ концентрація НДЦ, яка повністю зупиняла ріст даного збудника на 24 годину культивування. 1 мМ і 10 мМ золі НДЦ також виявилися ефективними і проти збудника кореневого раку плодівих дерев – *A. tumefaciens* УКМ В-1000. Зокрема, додавання до культуральної рідини 10 мМ золю НДЦ повністю зупиняло ріст даного патогена на 24 год. культивування (рис. 3б). Тобто, в ряду досліджених фітопатогенних бактерій найбільш чутливим до дії синтезованих наночастинок діоксиду церію виявився збудник бактеріального раку томатів *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂. Отримані результати відкривають перспективи для застосування НДЦ з метою захисту рослин від дії фітопатогенних бактерій та ставлять завдання подальшого дослідження даного явища.

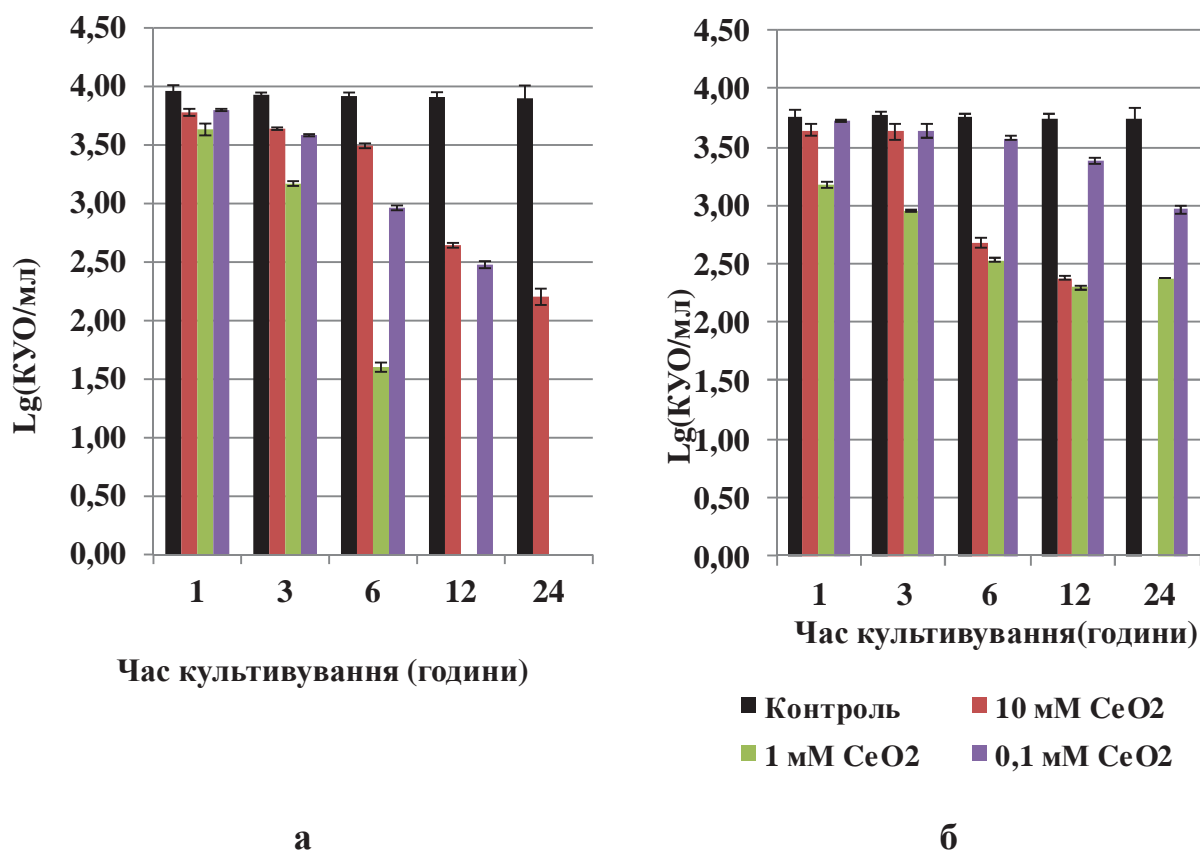


Рис. 3. Вплив різних концентрацій НДЦ на ріст фітопатогенних бактерій. (а – *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂, б – *Agrobacterium tumefaciens* УКМ В-1000).

Закономірним було вивчення можливого впливу НДЦ і на штамми симбіотичних діазотрофів сої, а також комплексний вплив екзометаболітів ефективних штамів *B. thuringiensis* та золь НДЦ різних концентрацій на ріст і розвиток *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂. Попередньо нами показано, що досліджувані штамми *B. thuringiensis* 98 та *B. thuringiensis* 0293 мають слабку бактериостатичну дію на *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂ та *C. michiganensis* subsp. *sepedonicum* Ас-1995 [2]. В ході попередніх лабораторних досліджень виявлено, що ризобії сої, в тому числі включені у дослідження штамми, не мають антагоністичної активності до ряду фітопатогенних бактерій. Вказане обґрунтувало адекватність вивчення впливу НДЦ на штамми бульбочкових бактерій сої з різним рівнем активності і високоактивні штамми *B. thuringiensis* з інсектицидними властивостями. В ході досліджень встановлено, що комплексне застосування 1 мМ чи 10 мМ НДЦ та екзометаболітів високоактивних штамів *B. thuringiensis* викликало максимальне пригнічення росту збудника бактеріального раку томатів (рис. 4). Так, у випадку *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂ статистично достовірний бактерицидний ефект спостерігався за синергентної дії 1 мМ, 10 мМ НДЦ та екзометаболітів штаму *B. thuringiensis* 0293 вже на 6 год. культивування. Крім того, 1 мМ золь НДЦ повністю призупинив ріст *B. thuringiensis* 0293 на 12 год. культивування, а додавання 10 мМ золь НДЦ справляло такий ефект на 24 год. культивування.

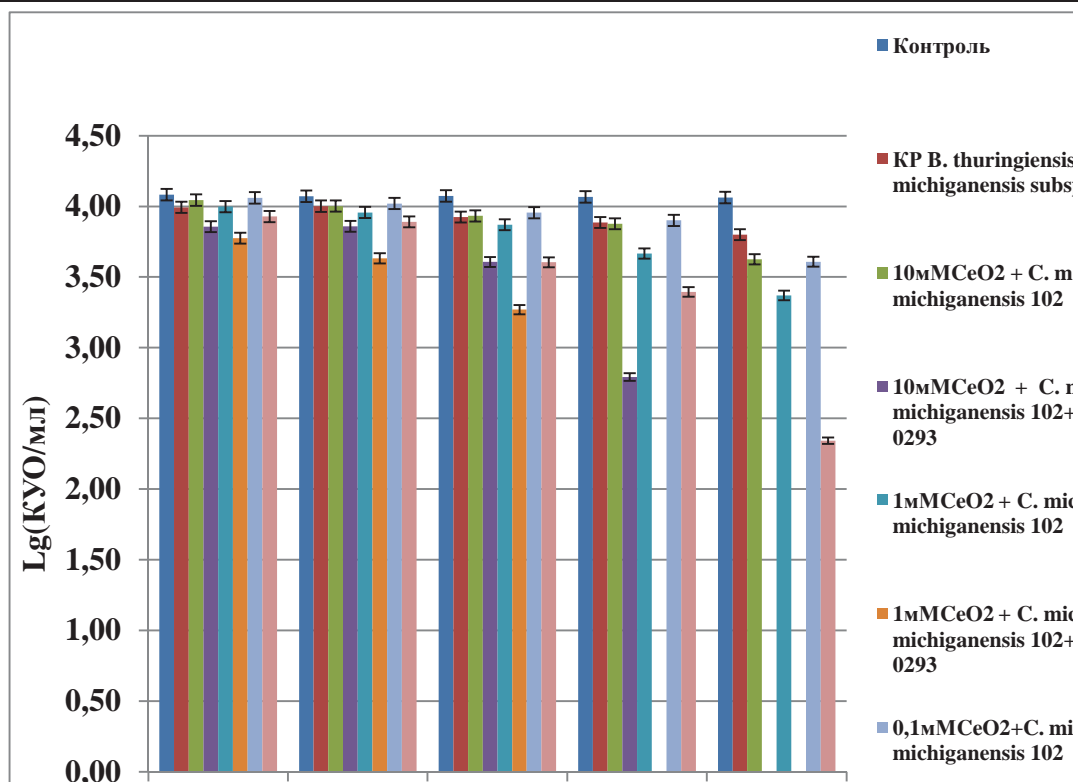


Рис. 4. Вплив різних концентрацій НДЦ та культуральної рідини штаму *Bacillus thuringiensis* 0293 на ріст *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂.

Аналогічна закономірність спостерігалася і за одночасної дії НДЦ та штаму *B. thuringiensis* 98. Найбільш ефективною в даному випадку виявилася композиція екзометаболітів *B. thuringiensis* 98 та 1 мМ концентрації нанокристалічного діоксиду церію (рис. 5).

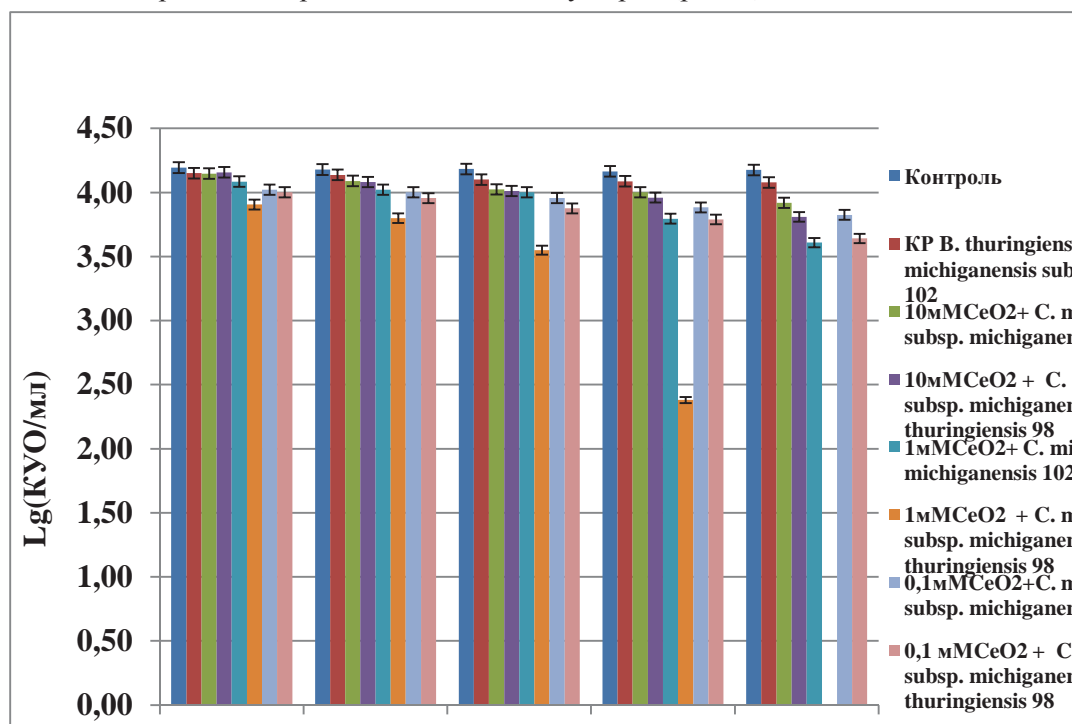


Рис. 5. Вплив різних концентрацій НДЦ та культуральної рідини штаму *Bacillus thuringiensis* 98 на ріст *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂.

Крім того, жодна із протестованих концентрацій НДЦ практично не впливала на ріст і розвиток високоактивного і неактивного штамів *B. japonicum* (рис. 5а, 5б). Ці дані відкривають перспективу подальших досліджень в розробці комплексних поліфункціональних препаратів з широким спектром дії на основі симбіотичних азотфіксувальних бактерій та наночастинок.

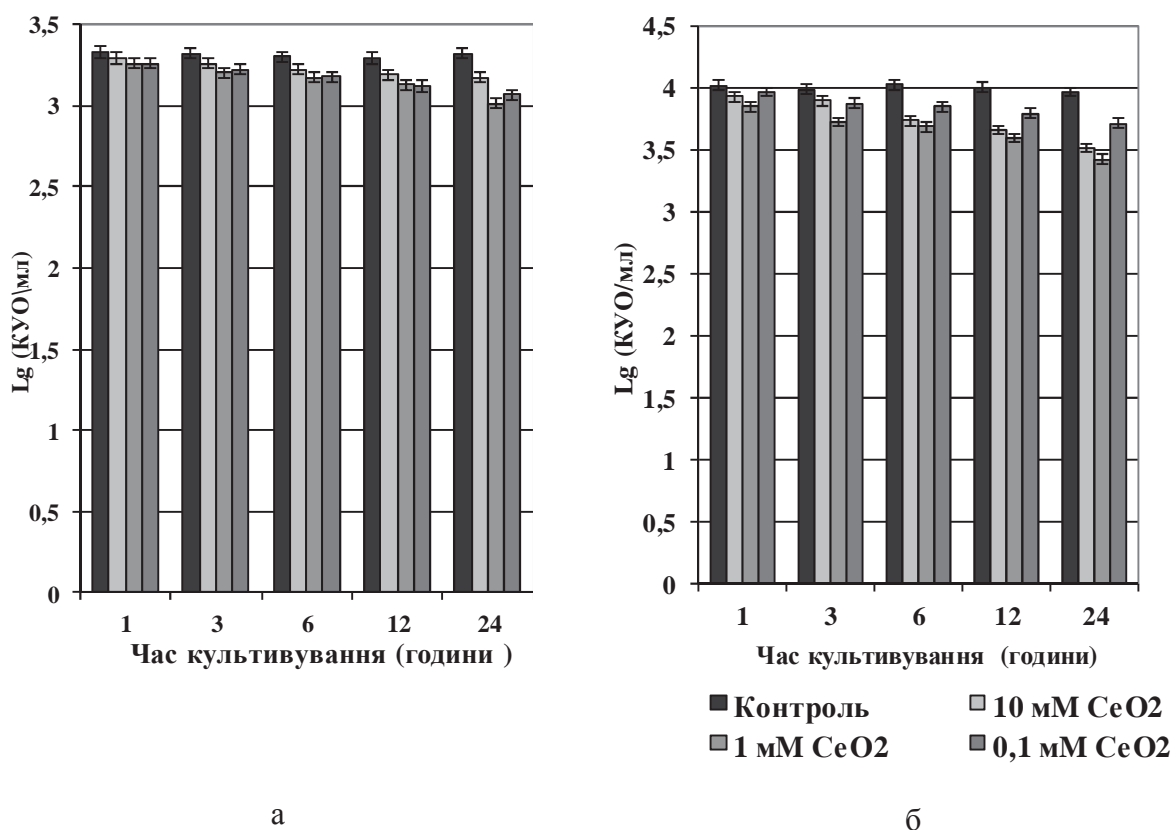


Рис. 5. Вплив різних концентрацій НДЦ на ріст *Bradyrhizobium japonicum*.
(а – *Bradyrhizobium japonicum* UKM B-6018, б – *Bradyrhizobium japonicum* 604 к).

Висновки

Вперше встановлено, що найбільшу антимікробну активність проти окремих фітопатогенних бактерій мають НДЦ в концентрації 1 мМ і 10 мМ або комплекси НДЦ та екзометаболітів штаму *B. thuringiensis*. Натомість, жодна з концентрацій НДЦ не впливає на штами *B. japonicum* різної ефективності. Встановлені нами факти відкривають перспективи для подальшого всебічного дослідження та можливого застосування даних наноматеріалів як окремо, так і в комплексах з мікроорганізмами у складі поліфункціональних препаратів для потреб екологічно безпечного рослинництва.

Автори висловлюють щире вдячність к.б.н. Н.М. Жолобак за побажання та зауваження в процесі планування експерименту та написання статті.

1. Дмитриева Е.Г. Наночастицы в медицине и фармацевтике / Е.Г. Дмитриева // *Фундаментальные науки и практика*. — 2010. — Т. 1, № 4. — С. 34—44.
2. Круть В.В. Антагоністичні властивості колекційних штамів *B. thuringiensis* до фітопатогенних бактерій / Круть В.В., Данкевич Л.А., Патики В.Ф. // *Матеріали XIII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М.Виноградського (01-06 жовтня 2013 р.)* — Ялта — 2013. С. 174.
3. *Наноструктури в біомедицині* / [Гонсалвес К.Е., Хальберштадт К.Р., Лоренсин К.Т., Наир Л.С.] — БИНОМ. Лабораторія знань. — 2012. — 536 с.
4. Полежаева О.С. Синтез нанокристаллического диоксида церия методами «мягкой химии» и изучение его структурно-чувствительных свойств: автореф. дис. канд. хим. наук: 26.11.08 / Ольга Сергеевна Полежаева. — М., 2008. — 26 с.

5. *Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин* / [Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М. та ін. / За ред. В.П.Патики. — Київ: ТОВ "НВП "Інтерсервіс", 2011. — 444 с.
6. *Babenko L.P., Zholobak N.M., Shcherbakov A.B., Voychuk S.I., Lazarenko L.M., Spivak M. Ya. Antibacterium activity of cerium colloids against opportunistic microorganism in vitro // Microbiologichny zhurnal. — 2012. — Vol. 74, N 3. — P. 78—85.*

Л.П. Бабенко, Л.А. Данкевич, Н.М. Жолобак, В.В. Круть, Н.О. Леонова, О.А. Демченко, Н.Я. Спивак, В.П. Патыка

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА РАЗНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ГРУППЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Исследовано влияние различных концентраций наночастиц диоксида церия и комплексов на их основании на рост отдельных штаммов фитопатогенных и медленно растущих симбиотических бактерий. Показано, что против отдельных штаммов фитопатогенных бактерий наиболее эффективны наночастицы церия в концентрации 1 мМ и 10 мМ или комплексы CeO₂ и экзометаболизмов *Bacillus thuringiensis*. Выявлено, что ни одна из исследованных концентраций наночастиц диоксида церия практически не влияет на рост симбиотических азотфиксирующих бактерий *Bradyrhizobium japonicum*.

Ключевые слова: наночастицы диоксида церия, фитопатогенные бактерии, экзометаболизмы Bacillus thuringiensis, Bradyrhizobium japonicum

L. P. Babenko, L.A. Dankevich, N.M. Zholobak, V. V. Krout, N. O. Leonova, O. A. Demchenko, M. Ja. Spivak, V.P. Patyka

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine

EFFECT OF VARIOUS CONCENTRATIONS OF CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON DIFFERENT PHYSIOLOGICAL GROUP OF MICROORGANISMS

The effect of various concentrations of cerium dioxide nanoparticles and complexes on its basis on the growth of certain strains of phytopathogenic and symbiotic bacteria has been investigated. It is shown that the 1 mM and 10 mM concentration of cerium dioxide nanoparticles or complexes of CeO₂ and exometabolites of *Bacillus thuringiensis* are the most effective against certain strains of phytopathogenic bacteria. It has been found that none of the investigated concentrations of cerium dioxide nanoparticles practically no effect on the growth of highly effective and ineffective strains of *Bradyrhizobium japonicum*.

Keywords: cerium dioxide nanoparticles, phytopathogenic bacteria, exometabolites of Bacillus thuringiensis, Bradyrhizobium japonicum

Рекомендує до друку
О.В. Шерстобоева

Надійшла 13.05.2014