

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

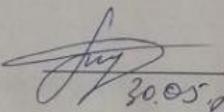
Кафедра биохимии и биофизики

**ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

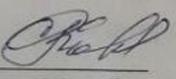
студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Дорошенко Алёны Анатольевны

Научный руководитель:
доцент, канд.биол. наук


30.05.2022

Е.С. Тучина

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
профессор, док. биол. наук


30.05.2022

С.А. Коннова

Саратов 2022

Введение. В растениеводстве в настоящее время остро стоит проблема защиты культурных растений от грибковых, вирусных и бактериальных заболеваний. Среднемировой уровень потерь вследствие поражения сельскохозяйственных растений фитопатогенными микроорганизмами, большая часть которых (до 80%) составляют грибы, оценивается в 20 % [1]. Наиболее распространенным средством борьбы с фитопатогенами является применение пестицидов, что вызывает опасения по поводу безопасности для человека и окружающей среды [2].

В последнее время фотодинамическая инактивация (ФДИ) микроорганизмов с использованием природных фотосенсибилизаторов зарекомендовала себя как мощный инструмент борьбы с бактериями и грибами.

Фотосенсибилизаторы (ФС) являются красителями природного или синтетического происхождения, которые под действием света способствуют генерации активных форм кислорода, приводящих к повреждению и гибели микроорганизмов. ФДИ обладает широким спектром действия по отношению к различным бактериям, грибам, вирусам и простейшим паразитам [3]. Доставка ФС непосредственно до микроорганизмов и их накопление в/на клетках являются одними из центральных задач ФДИ. В последнее время с целью повышения эффективности и увеличения аккумуляции фотосенсибилизаторов в микроорганизмах активно используются наноконтейнеры [4].

Одним из подходов к усилению эффективности ФДИ микроорганизмов является сорбция ФС на наночастицах, как из благородных металлов (золото и серебро), так и из природных минералов [5]. Альтернативой или дополнением к уже известным фотосенсибилизаторам могут стать сами наночастицы различной природы и структуры [6].

Повреждающее действие фотодинамического процесса обусловлено свободнорадикальными реакциями, поэтому развитие микробной устойчивости к ФДИ практически невозможно [7]. Тем самым подобный вид

борьбы с фитопатогенами является одним из самых перспективных и действенных.

Целью данной работы стало изучение чувствительности фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* к комплексному фотокаталитическому действию синего (405 нм) излучения и композитных материалов, содержащих наночастицы TiO_2 .

Для реализации поставленной цели в ходе работы были выявлены и решались следующие задачи:

1. Выделить из образцов плодовой гнили и идентифицировать наиболее часто встречающиеся штаммы фитопатогенных бактерий.

2. Изучить влияние нанокомпозитов $\text{TiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ на бактерии *P. syringae* без доступа света.

3. Проанализировать чувствительность клеток *P. syringae* к действию синего (405 нм, 17 мВт/см^2) светодиодного излучения.

4. Оценить эффективность комплексного фотодинамического воздействия с использованием нанокомпозитов $\text{TiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ и синего (405 нм, 17 мВт/см^2) светодиодного излучения на *P. syringae*.

В качестве материала использовали гнилые помидоры и яблоки, из которых выделили 15 штаммов микроорганизмов. Использовали 24 часовые культуры, выращенные на селективной плотной питательной среде КВС при 27°C .

Все проводимые микробиологические исследования осуществляли стандартными методами [8].

Для изучения поражений плодов томата и яблока, тщательно обрабатывали их мылом (для удаления поверхностного слоя микроорганизмов), чтобы исключить возможность попадания микроорганизмов с поверхности плодов в гниль. Затем делали навеску 10 образцов по 1 г и растирали в стерильной ступке с 9 мл физиологического раствора, полученные взвеси претерпевали разведения в 10, 100, 1000 раз. Высев осуществляли стерильными пипетками по 0,1 мл в чашки Петри с

селективными плотными средами КВС, МТ (для угнетения роста не фитопатогенных культур), распределяя штапелем по всей поверхности. Определяли индексы встречаемости (ИВ) для выделенных штаммов по формуле:

$$\text{ИВ} = (\text{число проб, содержащих штамм} / \text{общее число проб}) * 100\%$$

При изучении культуральных признаков штаммов отмечали размер и форму колоний, их края, консистенцию, цвет и поверхность. Изучали морфологические свойства изолятов (форма клеток, их взаиморасположение и подвижность, наличие спор, структуру клеточной стенки –методом окраски по Граму). Также исследовали биохимические свойства выделенных штаммов с целью их дальнейшей идентификации (способность к использованию цитрата и различных сахаров, способность к гидролизу казеина, желатины, крахмала, продукции аммиака и сероводорода, редукции нитратов и фиксации азота).

Для изучения сахаролитических свойств, применяли среды Гисса с добавлением глюкозы, сахарозы, арабинозы, ксилозы, лактозы, мальтозы, сорбита и маннита. При изучении ферментативной активности определяли наличие у штаммов каталазной и оксидазной активности. При изучении устойчивости к абиотическим факторам выявляли способность роста изолятов при различных показателях температуры (+ 10 и + 43 °С), рН среды (5, 9, 11) и концентраций NaCl в среде (2, 5, 7, 10, 15 %). Идентификация проводилась по Определителю бактерий Берджи путем анализа 30 фенотипических признаков [9-13].

Источником оптического излучения служил светодиод с максимальной длиной волны 405 нм, шириной полосы 20 нм и плотностью мощности 17 мВт/см². Тестировалось действие излучения в течение 5, 10, 15 и 30 мин.

Композитные наноструктуры были произведены в НИИ им. Фрумкина по оригинальной технологии и представляли собой сетку из нанопибрилл Al₂O₃ которая является матрицей для наночастиц TiO₂ [14].

Тестировались композиты с базой в виде Al_2O_3 , легированные наночастицами TiO_2 с различной концентрацией (таблица 1).

Таблица 1 – Состав исследуемых нанокомпозитов

Номер образца	Содержание TiO_2 , моль/л
НК 1	-
НК 5	0,15
НК 16	0,30

Во время исследования цитотоксичности композитов, бактериальную суспензию микроорганизмов объемом 2 мл добавляли в лунки полистирольного планшета, со средним диаметром 10 мм, в которую уже были помещены исследуемые материалы в виде пластинок диаметром 8 мм и толщиной 2 мм и оставляли в темноте на 30, 60, 90, 120, 150, 180 мин. Для тестирования фотокаталитической активности, проинкубированные в течение 30 мин суспензии подвергали облучению в течение 5, 10, 15 и 30 мин.

Облученные и необлученные суспензии объемом 0,1 мл высевали на питательную среду КВС для дальнейшего выращивания в течение 48 - 72 часов при $27^\circ C$.

В качестве контроля принимали КОЕ суспензии не подвергавшейся облучению и не обработанной НК. Так же дополнительно использовали КОЕ суспензии не обработанной НК, но подвергавшейся облучению для проверки влияния синего света (405 нм). Все эксперименты проводились с девятикратной повторностью.

Изменение выживаемости бактерий вычисляли отношением КОЕ бактериальной суспензии после обработки к отношению КОЕ контрольных образцов.

$$\text{Выживаемость} = \text{КОЕ (опыт)} / \text{КОЕ (контроль)} * 100\%$$

Обработка полученных данных проводилась в программе Statistica 10 при использовании р-критерия.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы, приложение и список использованных источников, включающий 80 источников на русском, английском и немецком языках. Работа изложена на 49 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 5 рисунками и 1 таблицей.

Основное содержание работы. В ходе проведения исследования было выделено 15 штаммов бактерий, которые были отнесены к 5 родам, из которых 2 штамма – грамположительные споровые палочки, 2 штамма – грамположительные кокки, 11 штаммов – грамотрицательные палочки (рисунок 1).

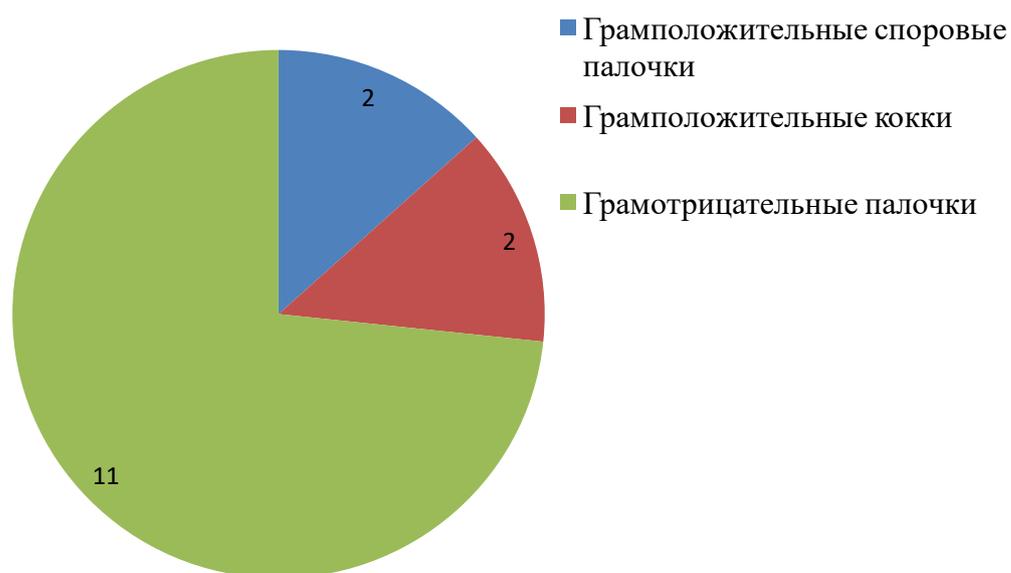


Рисунок 1 – Количество видов бактерий разных морфологических форм, выделенных из гнили плодов

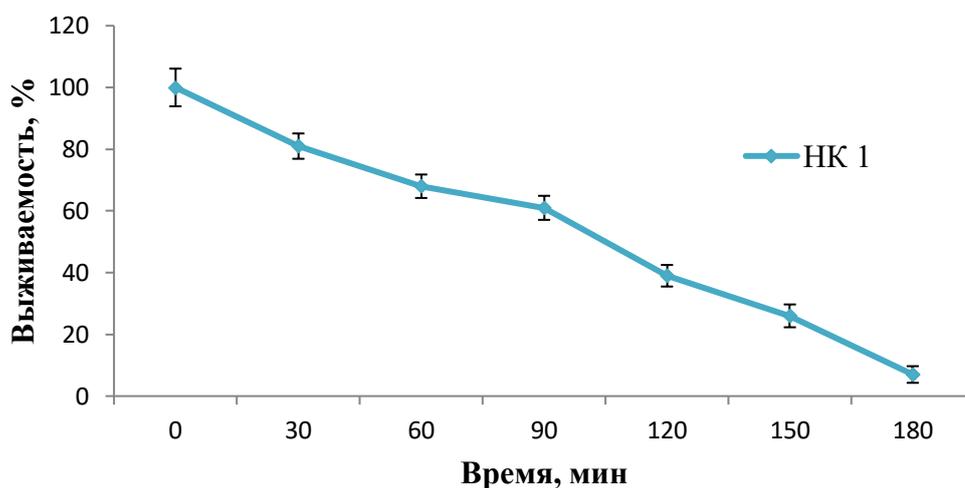
При дальнейшем анализе было идентифицировано 5 родов микроорганизмов, таких как *Pseudomonas* (ИВ 87%), *Bacillus* (ИВ 23%), *Erwinia* (ИВ 13%), *Xantomonas* (ИВ 13%), *Staphylococcus* (ИВ 10%).

На основании этих данных для дальнейших исследований был выбран штамм *Pseudomonas syringae* 11.

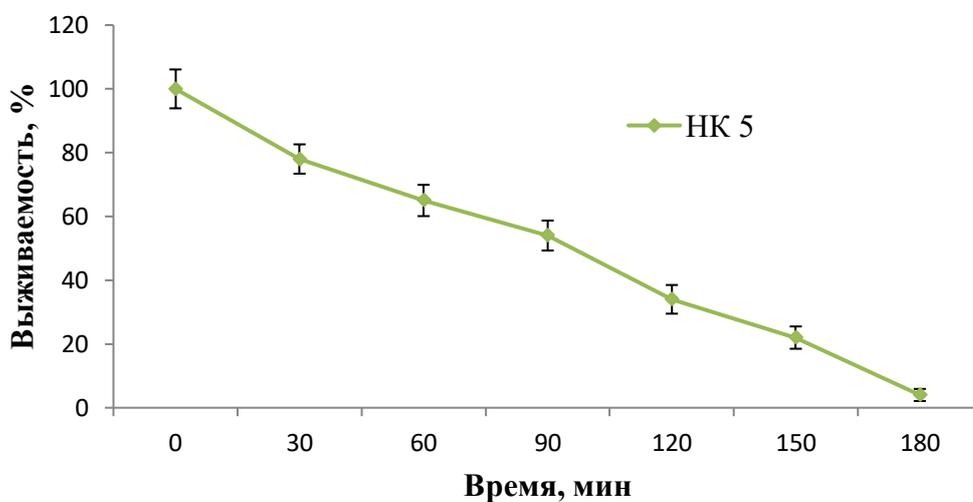
На первом этапе исследования выявлялась зависимость токсичности наноструктур от времени инкубации (рисунок 2). Полученные результаты показали, что токсичность исследуемых нанокомпозитов напрямую зависит от содержания TiO_2 .

Наиболее токсичными оказались композиты, содержащие 0,30 моль/л TiO_2 . Выживаемость микроорганизмов не превышала 49%, данный показатель наблюдался при минимальном времени воздействия (30 мин), с течением времени выживаемость линейно уменьшалась и достигла 25% при 180 минутах воздействия. Композит, содержащий 0,15 моль/л TiO_2 , показал хорошие результаты при длительном воздействии, выживаемость после 150 и 180 мин инкубации составила 22% и 4% соответственно, в то время как на протяжении 30-120 мин выживаемость не уменьшалась ниже 78%. Что касается композита, содержащего чистый Al_2O_3 , то выживаемость составила 81% при минимальном времени воздействия (30 мин), после чего линейно уменьшалась до 26% и 7% при 150 и 180 мин воздействия соответственно. При сравнении среднего времени воздействия (90 мин), было показано, что наименьшие значения выживаемости наблюдаются при использовании НК 0,30 моль/л TiO_2 , при котором выживаемость упала на 60% относительно контроля. Выявлено, что повышение токсичности при легировании TiO_2 в сравнении с чистым Al_2O_3 зависит от концентрации наночастиц, чем выше концентрация TiO_2 , тем выше токсичность.

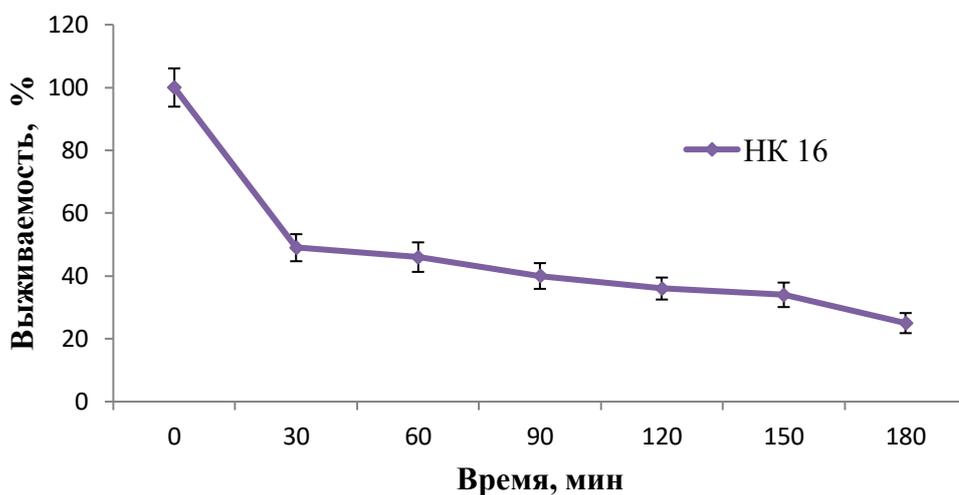
Подобные результаты позволяют предположить, что НК, содержащие 0,30 моль/л TiO_2 , можно использовать как самостоятельное антимикробное средство в борьбе с фитопатогенами. Стоит отметить, что значительное снижение выживаемости наблюдалось со 120 мин инкубации.



А



Б



В

А) НК 1 (чистый Al_2O_3); Б) НК 5 ($Al_2O_3+0,15$ моль/л TiO_2);

В) НК 16 ($Al_2O_3+0,30$ моль/л TiO_2)

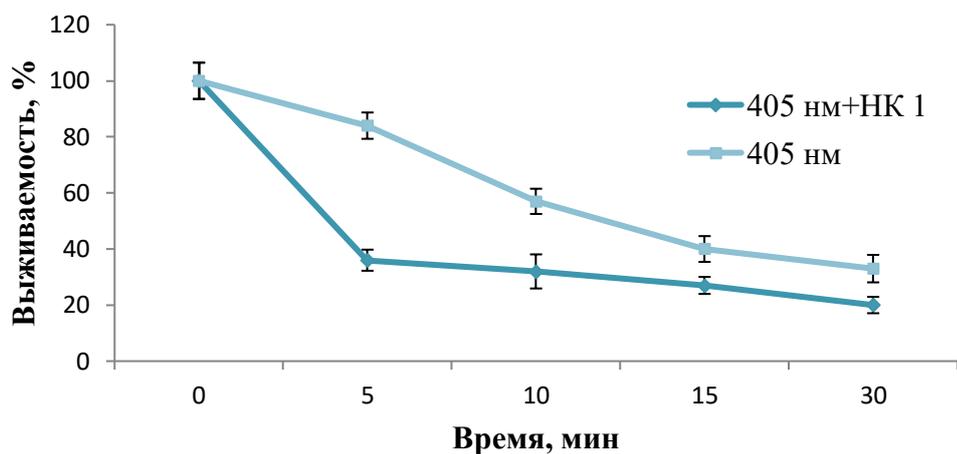
Рисунок 2 – Влияние времени инкубации с НК Al_2O_3/TiO_2 на выживаемость клеток *Pseudomonas syringae*

Для достоверной оценки фотокаталитической активности нанокompозитов требовалось проверить чувствительность исследуемых микроорганизмов только к синему излучению (405 нм). Было выявлено, что выживаемость *P. syringae* при 10 мин облучения составляет 57%, а при 30 мин снижается до 33%. Чувствительность микроорганизмов к излучению с длиной волны 405 нм можно объяснить наличием в их клетках сидерофоров, область поглощения которых лежит в диапазоне 400-415 нм [15].

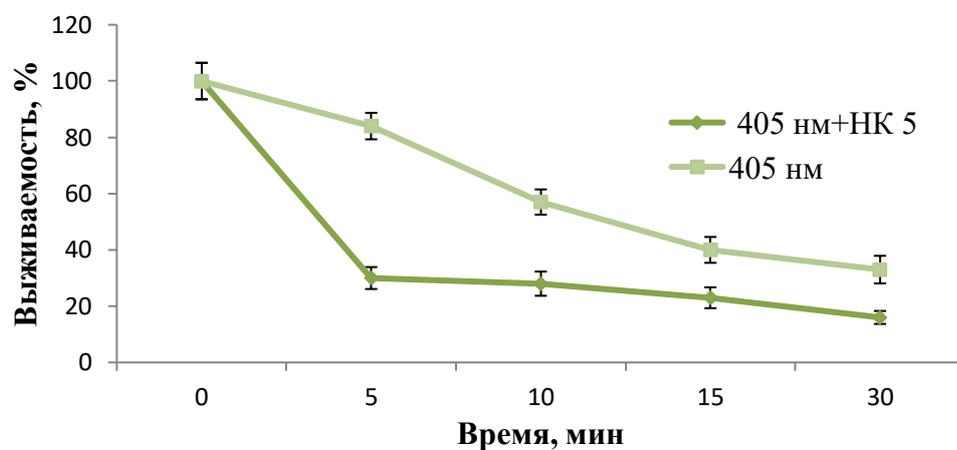
Тестирование фотокаталитической активности НК выявило их высокую активность. Наиболее эффективными оказались композиты с содержанием 0,30 моль/л TiO_2 . Воздействием в течение 5 мин удалось добиться значительного снижения выживаемости микроорганизмов, и она составила 15%. Увеличение времени облучения заметно уменьшает этот показатель: до 12% уже при 10 мин воздействия. При максимальном воздействии 30 мин выживаемость упала до 2%, что является максимальным показателем для данного материала (рисунок 3 В).

Среднюю фотокаталитическую активность проявил НК, содержащий 0,15 моль/л TiO_2 . Воздействие излучением в течение 5 мин снизило выживаемость до 30%. При дальнейшем воздействии выживаемость линейно падала и достигла минимального значения 16% при максимальном времени в 30 мин, ВТО время как при 15 мин воздействия она составила 23% (рисунок 3 Б).

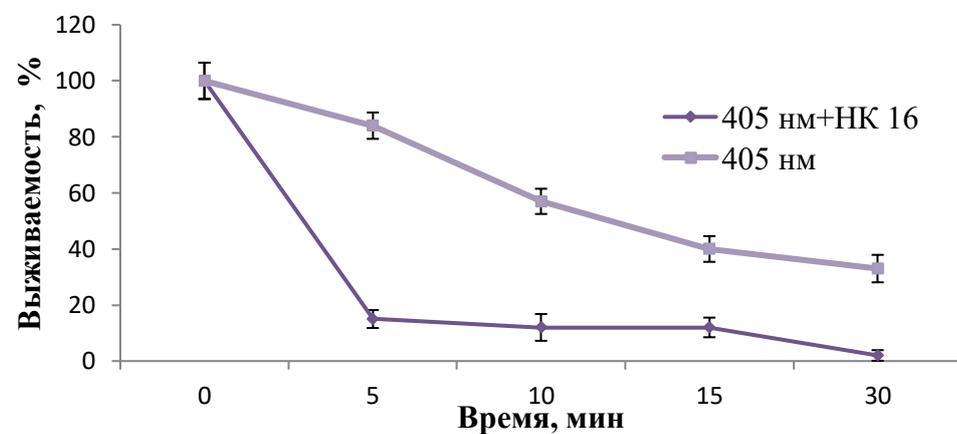
При воздействии НК содержащего чистый Al_2O_3 результаты уступали Al_2O_3 легированному TiO_2 , из чего следует что он является самым малоэффективным. Например, при воздействии излучения в течение 5 мин выживаемость составила всего 36%. В дальнейшем при увеличении времени воздействия данный показатель снижался до 32% и 27% при 10 и 15 мин соответственно. Максимального результата для данного образца удалось достигнуть при 30 мин воздействия, и он составил 20% выживаемости (рисунок 3 А).



А



Б



В

А) 405 нм+НК 1 (Al_2O_3); Б) 405 нм+НК 5 ($\text{Al}_2\text{O}_3+0,15$ моль/л TiO_2);

В) 405 нм+НК 16 ($\text{Al}_2\text{O}_3+0,30$ моль/л TiO_2)

Рисунок 3 - Влияние времени инкубации с НК $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ в сочетании со светодиодным излучением на выживаемость клеток *P. syringae*

Наше исследование показывает, что новые нанокompозиты $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ являются перспективным антибактериальным материалом против

фитопатогенов. Комбинация Al_2O_3 и различных концентраций TiO_2 позволяет добиться максимальной эффективности для различных целей человека. В ходе исследования был выявлен оптимальный состав композитов, в который входит $\text{Al}_2\text{O}_3+0,30$ моль/л TiO_2 . Он является таковым поскольку обладает высокой токсичностью, что позволяет использовать его самостоятельно, а также достичь лучших результатов подавления роста *P. syringae* при ФДИ.

В данной работе удалось добиться снижения выживаемости бактерий до 2% при использовании композита с составом 0,30 моль/л TiO_2 в сочетании со светодиодным излучением, а при инкубации в темноте 0,15 моль/л TiO_2 приводил к максимальному снижению выживаемости до 4% после 150 мин.

Значительные результаты (снижение численности бактерий более чем на 50%) были достигнуты за короткий промежуток времени, 5 минут облучения.

Стоит отметить, что при использовании нанокompозитов, как со светодиодным излучением, так и без него, бактериальный рост замедлялся. В то время как контролю было необходимо всего 24 часа для образования видимых колоний, культурам подвергшимся взаимодействию с НК и ФДИ понадобилось 48 и 72 часа соответственно.

Фотокаталитические эффекты возможны благодаря фотоиндуцированным электронами (e^-) и дырками (h^+) окислительно-восстановительным реакциям. В случае композитов $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ происходит рекомбинация электронов между двумя оксидами, что способствует дополнительному выходу активных радикалов. Антимикробное действие данных процессов обусловлено возникновением ряда окислителей в водном пространстве «наночастицы – клеточная стенка».

Заключение. Несмотря на то, что фотокаталитические свойства Al_2O_3 и его взаимодействие с другими наночастицами мало изучены, этот материал имеет ряд преимуществ. Как показало наше исследование, при воздействии на бактериальные клетки, значительное снижение роста бактерий начинается от 120 минут инкубации, независимо от легирования TiO_2 .

Некоторые литературные данные также показывают, что TiO_2 обладает высокой фотокаталитической активностью, а также пагубно влияет на фитопатогены при ФДИ, благодаря чему легированный им Al_2O_3 показал высокое значение антимикробного воздействия, при котором выживаемость падает до 2% при 30 минутах воздействия.

В данной работе было выявлено, что структура композитов, представленная сеткой из наноприбрилл Al_2O_3 на которые помещают наночастицы TiO_2 способствует значительному повышению антимикробной активности за счет оптимальной рекомбинации электронов в зоне проводимости, а также за счет предотвращения агрегации полученных структур.

Исходя из исследования можно сказать о том, что полученные в данные открывают новые возможности использования фотокатализаторов для контролируемого снижения численности фитопатогенов. Фотокаталитическая активность любых наноконпозитов зависит от большого количества параметров и характеристик самих наночастиц, входящих в их состав, что предоставляет возможность изменения и управления их фотокаталитическими свойствами.

На основе изученной литературы и полученных данных в ходе эксперимента можно предположить, что фотодинамическое воздействие с использованием $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ в будущем может быть использовано как безопасная альтернатива в борьбе с фитопатогенами.

Выводы.

1) В исследованных образцах плодовой гнили выявлено присутствие бактерий таких родов фитопатогенов как *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Xantomonas*; наибольшие значения индекса встречаемости (87%) отмечены для представителей рода *Pseudomonas*.

2) Показано, что наноконпозиты, содержащие 0,30 моль/л TiO_2 , вызывают значительное снижение выживаемости *P. syringae* (более 50%) начиная со 120 мин инкубации.

3) Установлено, что экспозиция 30 мин синего (405 нм, 17 мВт/см²) светодиодного излучения приводит к уменьшению численности *P. syringae* на 67%.

4) Обнаружено, что исследуемые наноконпозиты в сочетании с синем (405 нм, 17 мВт/см²) светодиодным излучением обеспечивают выраженную гибель бактериальных клеток (на 70-85%) уже после 5 мин комплексного воздействия; использование наноконпозита, содержащего 0,30 моль/л TiO₂, на фоне 30 мин экспозиции позволяет достичь уничтожения 98% популяции *P. syringae*.

Список использованных источников

1 Нанобиоконпозит на основе серебра с прилипателями как экологически безопасное средство защиты растений / И.Н. Юркова [и др.] // Международная междисциплинарная конференция «Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные вопросы получения и применения»: сборник материалов конференции: в 2 т. – К. : В.С. Мартынюк, 2013. – Т. 2. – С. 47.

2 Save the crop: photodynamic inactivation of plant pathogens I: bacteria / M. Glueck [et al.] // Photochemical and photobiological sciences. – 2019. – V. 18. – P. 1700–1708.

3 The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites / O.E. Akilov [et al.] // Chem Biol. – 2006. – V. 13, N. 8. – P. 839–847.

4 Photonic explorers based on multifunctional nanoplatfoms for biosensing and photodynamic therapy / Y.E. Koo [et al.] // Applied optics. – 2007. – V. 46, N. 10. – P. 1924–1930.

5 Enhanced photoinactivation of *Staphylococcus aureus* with nanocomposites containing plasmonic particles and hematoporphyrin / B.N. Khlebtsov [et al.] // Biophotonics. – 2013. – V. 6, N. 4. – P. 338–351.

6 Соколов, М.С. Здоровая почва как необходимое условие жизни человека / М.С. Соколов, Ю.Л. Дородных, А.И. Марченко // Почвоведение. – 2010. – N. 7. – С. 858–866.

7 In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn (II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy / F. Giuliani [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2010. – V. 54, N. 2. – P. 637–642.

8 Петерсон, А.М. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам / А.М. Петерсон, П.А. Чиров. – С. : Издательство Саратовского университета, 2005. – 24 с.

9 Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, И. Крига, П. Синта, Д. Стейми: в 2 Т. – М. : Мир, 1997. Т. 2. – 368 с.

10 Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, И. Крига, П. Синта, Д. Стейми: в 2 Т. – М. : Мир, 1997. Т. 1. – 432 с.

11 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. USA: Springer, 2001. V.3. – 1450 p.

12 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. USA: Springer, 2007. V.2. – 1136 p.

13 Garrity, G. M. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition / G. M. Garrity, J. A. Bell, T. G. Lilburn. –USA: Springer, 2004. – 399 p.

14 Тучина, Е.С. Фотокаталитическое действие светодиодного излучения (405 нм) и новых 3D-наноконпозитов Al₂O₃ на рост *Staphylococcus aureus* / Е.С. Тучина, А.В. Светлакова // Известия Саратовского университета. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2021. – N. 21. – С. 185–189.

15 Impact of siderophore production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 on epiphytic fitness and biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* / A. Wensing [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – V. 76, N. 9. - P. 2704–2711.