



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



БИОПОЛИМЕРНЫЕ КОМПОЗИТЫ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРОТИВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ФИТОПАТОГЕНА

Цивилева О.М.¹, Перфильева А.И.², Иванова А.А.³, Павлова А.Г.²

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
410049, Саратов, просп. Энтузиастов 13, email: tsivileva@ibppm.ru

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, д.132

³Иркутский институт химии имени А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, Иркутск, ул. Фаворского

Резюме

Исследовано влияние биокомпозиов селена, полученных из лекарственных макробазидиомицетов *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata*, *Laetiporus sulphureus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* на жизнеспособность фитопатогенной грамположительной бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Kotth.) Skapt et Burkh (Cms). Показано снижение жизнеспособности бактериальных клеток в результате инкубации с биокомпозиатами. Установлено определяющее влияние селенового компонента композиов на изучаемую биологическую активность. Обнаружена зависимость антимикробного действия селеносодержащих опытных образцов от биологического вида гриба. Показаны видоспецифические особенности проявления антибактериального эффекта биокомпозиов, содержащих биометалл(II), в сравнении с биополимерными субстанциями, полученными из того же гриба.

Ключевые слова: фитопатогены, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, высшие грибы, селен, биометаллы, биокомпозиаты, антибактериальная активность

Цитирование: Цивилева О.М., Перфильева А.И., Иванова А.А., Павлова А.Г. Биополимерные композиаты грибоного происхождения против бактериального фитопатогена. *Биомика*. 2018. Т.10(2). С.210-213. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-30

BIOPOLYMERIC COMPOSITES OF FUNGAL ORIGIN AGAINST THE BACTERIAL PHYTOPATHOGEN

Tsivileva O.M.¹, Perfilieva A.I.², Ivanova A.A.³, Pavlova A.G.²

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS
13 Prospekt Entuziastov, 410049, Saratov, Russia. email: tsivileva@ibppm.ru

²Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS
664033, 132 Lermontova str. Irkutsk, Russia

³Favorskii Institute of Chemistry, SB RAS. 664033, 1 Favorskogo str. Irkutsk, Russia

Resume

The impact of selenium biocomposites obtained from medicinal macrobasidiomycetes *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata*, *Laetiporus sulphureus*, *Lentinula edodes*, and *Pleurotus ostreatus* on the viability of the phytopathogenic Gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Kotth.) Skapt et Burkh (Cms) was studied. The impairment in bacterial cells viability resulted from their incubation with biocomposites was shown. The decisive role of composites' selenium component on the biological activity under question was established. The dependence of antimicrobial effect of selenium-containing specimen on the mushroom's systematic position was revealed. The species-specific peculiarities of antibacterial effect exerted by biometal(II)-containing biocomposites were shown in comparison to the biopolymeric substances obtained with the same mushroom.

Keywords: phytopathogens, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, higher fungi, selenium, biometals, biocomposites, antibacterial activity

Citation: Tsivileva O.M., Perfilova A.I., Ivanova A.A., Pavlova A.G. Biopolymeric composites of fungal origin against the bacterial phytopathogen. *Biomics*. 2018. V.10(2). P. 210-213. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-30 [In Russian]

Использование природных полимеров оказывает минимальные отрицательные экологические последствия при разработке и изготовлении новых композитных материалов различного назначения. Особый интерес представляют гибридные нанобиокомпозиты потенциально антимикробного элементного селена [Khiralla, El-Deeb, 2015]. Нами исследована возможность их получения на основе внеклеточных метаболитов высших грибов-макробазидиомицетов. Установлены и оптимизированы условия элиминирования селена в грибных культурах под влиянием диацетофенонилселенида (1,5-дифенилселенопентандион-1,5, бис(бензоилметил)селенид, препарат ДАФС-25) [Древко и др. (Drevko et al.), 2001]. Путем варьирования внешних условий культивирования грибов разработана методика управления биовосстановлением селенорганического субстрата с

образованием *in vivo* нанобиокомпозитов элементного селена [Цивилева и др. (Tsivileva et al.), 2017].

В настоящей работе изучали антибактериальную активность Se-содержащих нанобиокомпозитов, полученных на основе культур грибов родов *Ganoderma*, *Grifola*, *Laetiporus*, *Lentinula*, *Pleurotus*, выращенных в присутствии ДАФС-25. Использовали штамм Ас-1405 возбудителя кольцевой гнили картофеля (получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пущино, Московская обл.).

Применяли такие методические приемы, как проведение антимикробных тестов методом диффузии в агар, оценка бактериостатической активности с использованием величины оптической плотности бактериальной суспензии; изучение антимикробных свойств путем посева бактериальных культур, подвергнутых действию тестируемых агентов, для подсчета числа колониеобразующих единиц.

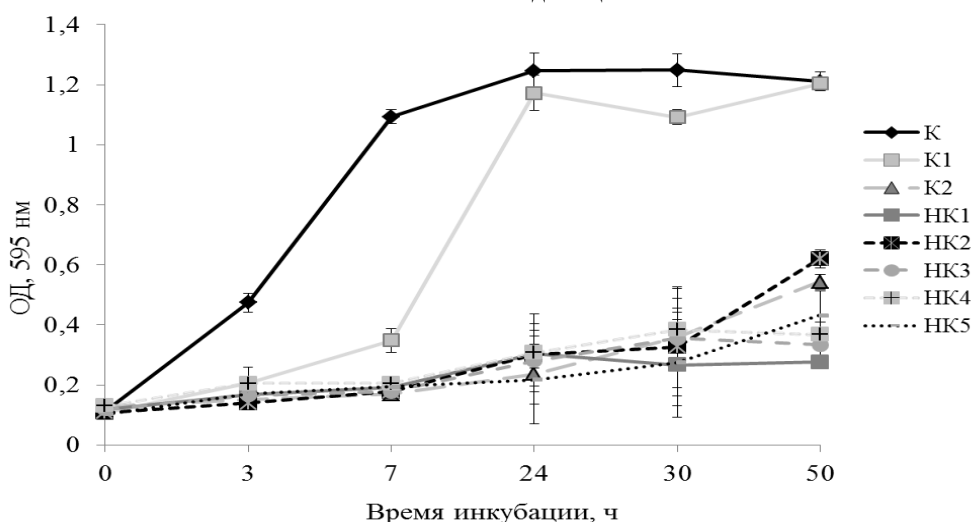


Рис. 1. Влияние биокомпозитов (в скобках указана концентрация Se, масс.%) на *Cms*.

K - бактериальная культура без добавок грибного происхождения; K1 - *Lentinula edodes* (0); K2 - *Ganoderma lucidum* (0); HK1 - *Ganoderma lucidum* (0.002); HK2 - *Grifola umbellata* (0.004); HK3 - *Pleurotus ostreatus* (0.003); HK4 - *Lentinula edodes* (0.003); HK5 - *Laetiporus sulphureus* (0.003)

Fig. 1. Effect of biocomposites (Se concentration, mass%, is in brackets) on *Cms*.

K - bacterial culture without supplements of fungal origin; K1 - *Lentinula edodes* (0); K2 - *Ganoderma lucidum* (0); HK1 - *Ganoderma lucidum* (0.002); HK2 - *Grifola umbellata* (0.004); HK3 - *Pleurotus ostreatus* (0.003); HK4 - *Lentinula edodes* (0.003); HK5 - *Laetiporus sulphureus* (0.003)

При добавлении Se-биополимерных композиций в питательные среды *Cms* наблюдали ухудшение роста бактерий. Установлено определяющее влияние

селенового компонента биополимерных композитов на изучаемую биологическую активность. Условия образования полимерных компонентов Se-содержащих

и Se-несодержащих грибных субстанций унифицировали по физико-химическим параметрам культивирования; предшествующего процедуре выделения композитов. Определение чувствительности фитопатогена к биокомпозитам проводили, используя метод измерения оптического поглощения бактериальных суспензий ("метод плотности суспензии"). Селенсодержащие агенты обладали гораздо более выраженным антибактериальным эффектом по сравнению с биополимерными субстанциями, полученными из того же гриба (рис. 1).

Представленные данные позволили судить о том, что композиты на основе биополимеров грибов различаются по степени выраженности бактерицидного действия в отношении возбудителя кольцевой гнили картофеля. Обнаружили зависимость антимикробного действия селенсодержащих опытных образцов от биологического вида гриба, глубинную культуру которого использовали для получения этих образцов. Имела место зависимость от уровня селена в составе

композита (рис. 1), однако при этом было ясно, что само по себе увеличение массовой доли Se не приводило к усилению эффекта.

Изучали антибактериальный эффект фракций грибных культур по отношению к возбудителю кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* при введении солей Cu(II), Fe(II), Zn(II), Co(II) в процесс выращивания.

Для изготовления металлсодержащих биообразцов мицелий выращивали глубинным способом, культуральную жидкость отделяли от мицелия фильтрованием, концентрировали выпариванием при 35°C. Сухую биомассу мицелия измельчали и экстрагировали смесями метанол: вода (4 : 1, v/v) из расчета 10 мл экстрагента на 0.1 г мицелия. Для анализа антибактериальной активности использовали как концентрат культуральной жидкости, так и мицелиальный экстракт, обработанный смесями этанол: вода (3 : 1, v/v).

Результаты исследования методом диффузии в агар представлены на рисунке 2.

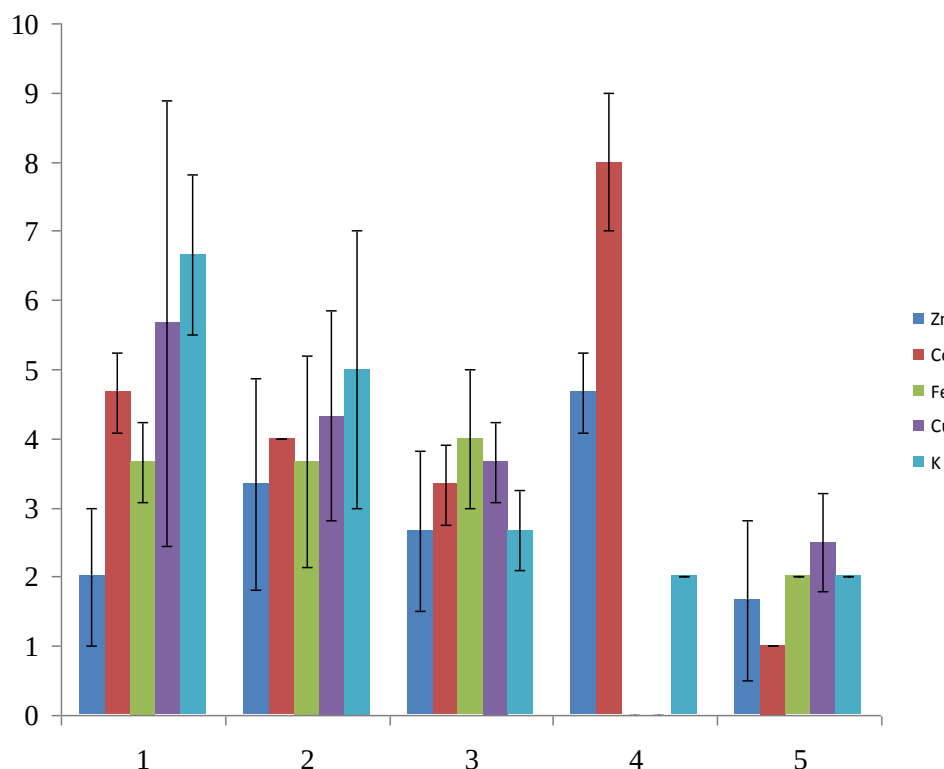


Рис. 2. Влияние на *Cms* (метод диффузии в агар) биокомпозитов (К), содержащих Cu, Fe, Zn, Co, на основе 1 – *Pleurotus ostreatus* HK352, 2 – *Ganoderma lucidum* 1315, 3 – *Lentinula edodes* F-249, 4 – *Grifola umbellata* 1622, 5 – *Laetiporus sulphureus* 120707
Fig. 2. Effect on *Cms* (agar diffusion method) of biocomposites (K) containing Cu, Fe, Zn, Co, based on 1 – *Pleurotus ostreatus* HK352, 2 – *Ganoderma lucidum* 1315, 3 – *Lentinula edodes* F-249, 4 – *Grifola umbellata* 1622, 5 – *Laetiporus sulphureus* 120707

Из представленных данных видно, что композиты на основе биополимеров грибов различаются по степени выраженности бактерицидного действия в отношении кольцевой гнили картофеля в зависимости от металла в составе биокомпозита. Способность угнетения роста возбудителя кольцевой гнили картофеля, выявленная у композита из *Grifola umbellata* при использовании добавки соли цинка (рис. 2) – единственный случай проявления этим металлом в составе биокомпозита изучаемой биологической активности, превышающей таковую у всех биокомпозитов другого состава. Следует отметить очень умеренную способность угнетения роста тест-микроорганизма, выявленную при использовании биокомпозита на основе кобальта. Получение биополимерных тестируемых субстанций (рисунок 2, К) при исключении соли металла из питательных сред базидиомицетов *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata* не приводило к резко сниженной способности подавлять *Cms*. Бактерицидную активность субстанций на основе этих культур в отношении бактериального фитопатогена мы выявили и в отсутствие металлосодержащих компонентов питательной среды (рис. 2).

Определение чувствительности фитопатогена к биокомпозитам также проводили, используя метод измерения оптического поглощения бактериальных суспензий. Обнаружена зависимость антимикробного действия металлосодержащих опытных образцов от биологического вида гриба, глубинную культуру которого использовали для получения этих образцов.

Бактериостатическая активность биокомпозитов на основе культур *Pleurotus ostreatus* и *Laetiporus sulphureus* в отношении бактерий *Cms* обнаруживалась и в отсутствие Cu, Fe, Zn или Co в составе питательной среды. Максимальной бактериостатической активностью обладали биокомпозиты на основе внеклеточных метаболитов *Laetiporus sulphureus*. 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*.

Определяющего влияния металла как компонента биополимерных композитов на изучаемую биологическую активность не установлено. Некоторым положительным эффектом в аспекте усиления бактериостатической активности металлосодержащего биокомпозита по сравнению с не содержащей металла биополимерной грибной субстанцией обладали медь и цинк. Металлосодержащие биокомпозиты не обладали

преимуществом и в отношении бактерицидного действия на *Cms* (рисунок 2). Исключение составили варианты опыта *Zn-Grifola umbellata* и *Fe-Laetiporus sulphureus*, в которых соответствующие Zn- и Fe-содержащие биокомпозиты оказались более эффективными.

Таким образом, предложенные селенсодержащие субстанции грибного происхождения обладают бактериостатической и бактерицидной активностью в отношении фитопатогена, вызывающего кольцевую гниль картофеля. Показаны видоспецифические особенности проявления антибактериального эффекта селен- и металлосодержащих биокомпозитов, полученных на основе грибных культур разной систематической принадлежности. При этом металлосодержащие биокомпозиты, в сравнении с биополимерными субстанциями, полученными из того же гриба, в большинстве случаев не обладали существенно более выраженным антибактериальным эффектом.

Работа частично поддержана грантом РФФИ (проект № 17-38-50055_мол-нр).

Литература

1. Древяко Б.И., Древяко Р.И., Антипов В.А., Чернуха Б.А., Яковлев А.Н. Средство для лечения и профилактики инфекционных заболеваний и отравлений животных и птиц, повышающее их продуктивность и сохранность. Патент РФ № 2171110.
2. Цивилева О.М., Свистунов А.А., Кофтин О.В., Древяко Я.Б., Бородулин В.Б., Бородулина Е.В., Саратцев А.В. Способ получения бионаноконкомпозитов селена. Заявка на патент РФ № 2017113654 от 19 апреля 2017 г.
3. Khiralla G.M., El-Deeb B.A. Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*. 2015. V. 63(2). P. 1001-1007. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.086

References

1. Drevko BI, Drevko RI, Antipov VA, Chernukha BA, Yakovlev AN. Remedy for treatment and prophylactics of infectious diseases and poisonings of animals and poultry enhancing their productivity and vitality. Russian Patent no. 2171110 of the Russian Federation. (In Russian).
2. Khiralla G.M., El-Deeb B.A. Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*. 2015. V. 63(2). P. 1001-1007. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.086
3. Tsivileva O.M., Svistunov A.A., Koftin O.V., Drevko Ya.B., Borodulin V.B., Borodulina E.V., Sarattsev A.V. Method of obtaining the selenium bionanocomposites. Patent application no. 2017113654 (19 April 2017) of the Russian Federation. (In Russian).