

## ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА КАДМИЯ, НА УРОВЕНЬ БИОЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛА

© 2023 г. О. А. Журавлева<sup>1,\*</sup>, Т. А. Воейкова<sup>1</sup>, В. С. Кулигин<sup>1</sup>, Е. И. Кожухова<sup>2</sup>,  
П. А. Жданов<sup>2</sup>, Н. В. Булушова<sup>1</sup>, В. Г. Дебабов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт” – Курчатовский комплекс генетических исследований, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт” – ИРЕА, Москва, Россия

\*E-mail: zhuravlevaolgga@gmail.com

Поступила в редакцию 13.09.2022 г.

После доработки 13.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Рассмотрено влияние бактерий *Shewanella oneidensis* MR-1 и *Bacillus subtilis* 168, применяемых для биосинтеза наночастиц NPsCdS, на уровень антимикробной активности NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* в отношении широкого спектра микроорганизмов – грам(+), грам(–) бактерий, дрожжей и плесневых грибов. Показано, что *S. oneidensis* MR-1 и *B. subtilis* определяют количественные характеристики наноматериала – содержание доли белка и CdS в образцах NPsCdS. Использование методов атомно-эмиссионной спектроскопии для определения элементного содержания кадмия и серы, денситометрического анализа электрофореграмм белка, адсорбированного на поверхности биогенных NPsCdS, продемонстрировало значительное различие в соотношении этих компонентов у NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus*. Установлено, что доля CdS в образцах NPsCdS/*Bacillus* превышает в 1.4 раза данный параметр для NPsCdS/*Shewanella*. При этом доля белка в образцах NPsCdS/*Bacillus* снижена по сравнению с NPsCdS/*Shewanella*. Показано, что уровень антимикробной активности NPsCdS/*Bacillus* в отношении всех исследованных тест-культур превышает аналогичный показатель для NPsCdS/*Shewanella*. Предполагается, что увеличение доли CdS у образца NPsCdS/*Bacillus* может быть причиной более высокого уровня биоцидной активности NPsCdS за счет повышенного количества высвобождающихся Cd<sup>2+</sup>, что приводит к генерации активных форм кислорода и разрушению клеток микроорганизмов. Доказаны важность и необходимость отбора бактериальных штаммов для создания функционально активных наночастиц с оптимальными характеристиками. Результаты подтверждают перспективность применения биогенных NPsCdS в качестве антимикробных агентов направленного действия.

DOI: 10.56304/S1992722323010223

### ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики интенсивно применяют с середины XX века в медицине, сельском хозяйстве, пищевой индустрии. Длительное, чрезмерное и зачастую бесконтрольное использование этих препаратов, их накопление в почве и воде привело к появлению и развитию микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [1]. Патогенные микроорганизмы вырабатывали устойчивость практически ко всем известным видам антибиотиков, при этом за последние годы не было открыто принципиально новых классов противомикробных средств [2]. Появление микроорганизмов с МЛУ происходит за счет возникновения мутаций в хромосомной или плазмидной ДНК при действии на клетки антимикробного средства либо путем горизонтально-

го переноса генов устойчивости. ВОЗ объявила устойчивость к противомикробным препаратам одной из “самых больших угроз глобальному здравоохранению” [3]. Таким образом, в мире существует запрос на создание новых типов противомикробных средств, устойчивость к которым развивалась бы с низкой эффективностью.

Развитие отрасли нанотехнологии, получение наноматериалов различного химического состава, возможность их применения в медицине дают основания для поиска антимикробных агентов нового поколения. В качестве альтернативы и дополнения традиционным антибиотикам исследуется биоцидная активность наночастиц (НЧ) металлов, их оксидов и сульфидов. Появился термин “нано-антибиотики”, обозначающий материал наноразмерного ряда (от 1 до 100 нм), проявляющий

биоцидную активность против патогенных микроорганизмов [4, 5], либо повышающий эффективность действия антибиотиков в составе НЧ [6].

Установлено, что НЧ воздействуют одновременно на различные процессы жизнедеятельности микроорганизмов, и для развития устойчивости к биоцидной активности НЧ в клетке должно произойти одновременно множество мутаций [7, 8]. Основным механизмом антимикробного действия наноматериалов является фотокаталитическое образование активных форм кислорода (АФК), которые повреждают клеточные структуры, в первую очередь бактериальную стенку/мембрану, далее происходит прерывание процесса передачи энергии, ингибирование активности ферментов и синтеза ДНК, что приводит к гибели клеток. Антимикробную активность нанокристаллов часто объясняют их адгезией к клеточной стенке, обусловленной разницей в электрических зарядах отрицательно заряженной мембраны и НЧ. Такое взаимодействие приводит к конформационным и морфологическим изменениям — усадке цитоплазмы, отслоению мембраны с нарушением проницаемости клеток. Оказавшись внутри клетки, НЧ негативно воздействуют на ферментативные процессы и ДНК с необратимым повреждением трансляции белка, что приводит к гибели клеток [9]. В [7] подробно рассмотрены механизмы антимикробного действия НЧ серебра, оксидов цинка и титана, типы повреждений, а также возможности их практического применения.

Среди НЧ металлов и их производных особую нишу занимают халькогениды металлов, в том числе наночастицы сульфида кадмия (NPsCdS) с характеристиками квантовых точек (КТ). Для этих полупроводниковых материалов характерны высокий квантовый выход, узкий и симметричный пик люминесценции, большая ширина запрещенной зоны, высокая фотостабильность, что обеспечивает применение этих соединений в различных областях промышленности. Подобные материалы предлагается использовать также в биомедицине. Действительно, НЧ халькогенидов металлов нашли применение *in vivo* для визуализации, мечения клеточных компонентов и белков, диагностики рака [10, 11]. Физико-химические методы получения НЧ сложны и энергозатратны, предполагают участие синтетических поверхностно-активных веществ (ПАВ) для стабилизации наноструктур, органических растворителей, агрессивных реагентов, действие которых может привести к образованию токсичных побочных продуктов, что нарушает экологическую безопасность. Показано, что NPsCdS с покрытием поверхности химическими ПАВ оказывают значительное цитотоксическое поврежде-

ние эукариотических и прокариотических организмов [12, 13].

Механизм биоцидного действия NPsCdS связывают с высвобождением ионов кадмия ( $Cd^{2+}$ ) из NPsCdS в клеточную среду и образованием АФК. Относительно механизма высвобождения  $Cd^{2+}$  из NPsCdS было постулировано, что атомы серы (S), расположенные на поверхности КТ NPsCdS, могут окисляться молекулами  $O_2$  с образованием  $SO_4^{2-}$ , с последующей их десорбцией в раствор и генерацией свободных ионов  $Cd^{2+}$ . Известно, что активаторами образования АФК являются ионы тяжелых металлов, в том числе  $Cd^{2+}$ , которые также могут легко связываться с SH-группами белков, приводя к нарушению функции и конформационной структуры ферментов, что негативно сказывается на метаболизме и физиологии клетки, приводя ее к гибели [14, 15].

Важным направлением современных исследований по созданию НЧ различного химического состава является разработка экологически безопасного синтеза наноматериала с использованием биологических субстанций, в частности микроорганизмов. Природная способность микробов эффективно восстанавливать ионы металлов до нерастворимых соединений в наноразмере, большое разнообразие и доступность коллекций микроорганизмов делают их перспективными для биогенного синтеза НЧ [16–18]. Наличие на поверхности НЧ молекул белков, аминокислот, полисахаридов, выделяемых микроорганизмами в процессе биосинтеза, определяет стабильность, биосовместимость и биологическую активность наноматериала [19]. Адсорбированный слой биомолекул может снижать количество активных ионов на поверхности биогенных нанокристаллов, контактирующих с клеточной стенкой бактерий [5].

Сравнительный анализ токсического действия КТ сульфида кадмия (CdSQDs), полученных химическим и биогенным синтезом с применением микроскопического гриба *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, в отношении бактерий *Escherichia coli* и ростков *Lactuca sativa L.* показал, что химические CdSQDs подавляли рост *E. coli* дозозависимым образом в отличие от биогенных CdSQDs, которые проявляли антибактериальную активность только при самой высокой концентрации. Биогенные КТ не ингибировали прорастание семян *L. sativa L.* в отличие от химических CdSQDs. Согласно [20] биологическое покрытие биогенных CdSQDs снижает их токсическое действие на бактерии и семена растений. Отметим, что важную роль в определении уровня антибактериальной и цитотоксической активности биогенного наноматериала играет выбор микроорганизмов, используемых для синтеза НЧ. Так, использование микроорганизмов *Shewanella oneidensis* [21] и

*Aspergillus niger* [22] позволило синтезировать NPsCdS с антимикробной и цитотоксической активностями. Приводятся данные об антимикробном действии биогенных NPsCdS, в том числе в отношении МЛУ [9]. В исследованиях [23–25] показано влияние бактерий различных таксономических групп, использованных для биосинтеза NPsAg<sub>2</sub>S, NPsZnS, NPsCdS, на их физико-химические характеристики.

Целью данной работы являлась оценка влияния *S. oneidensis* MR-1 и *Bacillus subtilis* 168, использованных для микробного синтеза NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus*, на уровень биоцидной активности биогенных НЧ в отношении бактерий, микроскопических грибов – дрожжей и плесневых грибов. Исследование количественного соотношения компонентов NPsCdS – содержания элементов Cd, S и белковой фракции в составе образцов NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus*, уравненных по массе, для определения роли *S. oneidensis* MR-1 и *B. subtilis* 168 в формировании структуры NPsCdS–белок.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Штаммы микроорганизмов, использованные в работе, были предоставлены Национальным биоресурсным центром – Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт”. Культивирование микроорганизмов проводили при оптимальных температурах на питательных средах, состав которых указан на сайте НБЦ – ВКПМ НИЦ “Курчатовский институт” [26]. Штаммы бактерий: *Bacillus amyloliquefaciens* (B-11265), *Bacillus licheniformis* (B-10956), *Bacillus subtilis* 168 (B-7360), *Enterococcus faecalis* (B-12629), *Escherichia coli* K-12 (B-6195), *Pseudomonas putida* (B-4492), *Rhodococcus rhodochrous* (AC-1093), *Salmonella typhimurium* (B-3533), *Serratia marcescens* (B-11334), *Shewanella oneidensis* MR-1 (B-9861), *Staphylococcus epidermidis* (Bp12635), *Streptococcus salivarius* (B-5994). Штаммы одноклеточных микроскопических грибов (дрожжей): *Candida albicans* (Y-3108), *Saccharomyces cerevisiae* (Y-3251). Штаммы плесневых грибов: *Aspergillus niger* (F-1057), *Cladosporium cucumerinum* (F-1081), *Fuzarium graminearum* (F-877).

Микробный синтез NPsCdS с использованием бактерий *S. oneidensis* MR-1 и *B. subtilis* 168, выделение, очистку и концентрирование водных суспензий НЧ проводили в соответствии с методикой [25].

Концентрацию биогенных NPsCdS определяли гравиметрическим методом, устанавливая корреляцию между значениями оптической плотности и весовым значением высушенных до постоян-

ной массы NPsCdS в расчете на 1 мл водной суспензии. Взвешивание проводили с использованием аналитических весов Ohaus Explorer EX224 (Ohaus, США). Оптическую плотность суспензий определяли с использованием фотоколориметра КФК-3КМ (Юнико-Сис, Россия) при длине волны 440 нм [27].

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* оценивали в жидкой среде в отношении грам(+) бактерии *B. licheniformis*. Концентрации образцов NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* были уравнены и составляли 2 мг/мл (2000 мкг/мл). В стерильные пробирки, содержащие 5 мл Luria–Vertani (LB) и 0.1 мл суспензии клеток ночной культуры (НК) бактерии, вносили водные суспензии NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* до достижения следующих концентраций (мкг/мл): 40, 30, 20, 10, 4, 3, 2 (реакционные образцы). В контрольную пробирку NPsCdS не вносили. Все образцы инкубировали на круговой качалке (220 об./мин) при 37°C в течение 24 ч. Определяли КОЕ всех образцов методом титрования на агаризованной среде LB (LBA) в соответствующих разведениях и проводили расчет МИК для обоих типов NPsCdS.

Ингибирующее действие NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* на рост тест-культур бактерий, дрожжей и грибов оценивали методом диффузии НЧ в агар [28]. Для бактериальных культур и дрожжей клетки каждой тест-культуры переносили в 1 мл стерильной воды (титр клеток  $1 \times 10^9$  кл/мл), суспендировали и затем вносили в 40 мл охлажденной до 30°C питательной среды, соответствующей потребностям штамма и содержащей 0.8% агара, перемешивали и разливали в чашки Петри диаметром 90 мм. Для трех культур плесневых грибов водную суспензию спор вносили в расплавленные среды с 1.5%-ным содержанием агара. После охлаждения среды в толще агара металлическим пробойником делали лунки диаметром 8 мм. В каждую лунку, предназначенную для оценки действия НЧ на тест-культуры бактерий, добавляли водную суспензию NPsCdS в концентрации 3 мг/мл, в лунку вносили 50 мкл, что составляет 150 мкг в лунке. Для определения чувствительности микроскопических грибов (дрожжей и плесневых грибов) использовали суспензию NPsCdS/*Bacillus* в концентрации 8 мг/мл, в лунку вносили 50 мкл, что составляет 400 мкг в лунке. В качестве контроля в лунку вносили стерильную воду в том же объеме. Далее чашки инкубировали при оптимальной температуре роста микроорганизмов в течение времени, необходимого для развития тест-культуры. Эксперимент проводили трижды, воздействие биогенных NPsCdS на тест-культуры оценивали по величине диаметра зоны ингибирования (в миллиметрах) и представляли ее как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

*Определение элементного содержания кадмия и селена в образцах NPsCdS* проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с использованием оптического эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой iCAP-6300 Duo (Thermo Scientific, США). В качестве пробоподготовки сухие навески по 0.1 г каждого образца NPsCdS предварительно растворяли в 2.5 мл концентрированной азотной кислоты и выдерживали при 110°C в течение 1 ч в системе разложения проб Hotblock 200 (Environmental Express, США), после чего раствор доводили до 50 мл дистиллированной водой и разбавляли в 100 раз 2%-ной азотной кислотой. Измерение содержания кадмия проводили с помощью многоэлементного градуировочного стандарта. Концентрация обоих типов NPsCdS в водных суспензиях составляла 3.1 мг/мл.

*Определение количества белка*, адсорбированного на поверхности биогенных NPsCdS, проводили методом денситометрического анализа электрофореграмм с помощью программного обеспечения TotalLabPhoretix 1D, в качестве белка-стандарта использовали рибонуклеазу с молекулярной массой 14 кДа. Предварительно белок с поверхности НЧ экстрагировали для денатурирующего электрофоретического разделения белков в 12.5%-ном полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) [25].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Микробный синтез НЧ* с использованием бактерий разных видов (*S. oneidensis* MR-1 и *B. subtilis* 168) позволяет получать NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* с характеристиками нанокристаллов сферической формы размерами  $5 \pm 1$  нм. Однако физические и оптические характеристики – гидродинамический диаметр, величина  $\zeta$ -потенциала, интенсивность флуоресценции, а также состав белкового слоя на поверхности биогенных NPsCdS – зависят от применяемого для биосинтеза штамма [25].

Способность НЧ проявлять биоцидную активность в отношении тест-культур микроорганизмов является одной из функциональных характеристик наноматериала. Для определения уровня биоцидной активности NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* была оценена величина МИК наночастиц обоих типов. Методы определения МИК противомикробных веществ, как антибиотиков, так и НЧ, основаны на подавлении ими роста клеток тест-культур в жидкой среде со снижением КОЕ или при диффузии в агаризованную среду с образованием зон ингибирования. Значения МИК в жидкой и агаризованной средах могут различаться в связи с разной степенью диффузии биоцидного агента в жидкую и агаризованную среды и контакта с клетками [29, 30].

*Определение МИК NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus в жидкой среде.* В качестве тест-культуры использовали грам(+) бактерию *B. licheniformis*. Титр клеток *B. licheniformis* после 24 ч инкубации в отсутствие NPsCdS составлял  $(2-3) \times 10^9$  кл/мл. Показано, что рост бактерии не ингибируется в реакционных образцах при концентрациях NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus*, составляющих 2, 3, 4 и 10 мкг/мл. Установлено, что МИК для NPsCdS/*Bacillus* составляет 20 мкг/мл, при этом КОЕ =  $(7-8) \times 10^8$  кл/мл, а для NPsCdS/*Shewanella* – 30 мкг/мл, КОЕ =  $(7.7-8.5) \times 10^8$  кл/мл. При концентрации 40 мкг/мл титр клеток снижается примерно на 1.5 порядка для обоих типов NPsCdS. Таким образом, значения МИК NPsCdS, при которых подавляется рост клеток *B. licheniformis*, различаются для NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus*, что подтверждает влияние штаммов, использованных для биосинтеза, на функциональную активность НЧ.

*Эффективность биоцидной активности NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus в агаризованной среде.* Сравнительный анализ антимикробной активности NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* был проведен в отношении широкого круга микроорганизмов, принадлежащих различным таксонам, методом диффузии наночастиц в LBA-среде, содержащей клетки тест-культур. Как видно из представленных в табл. 1 результатов, для всех исследуемых и чувствительных к действию наноматериала тест-культур уровень антимикробной активности NPsCdS/*Bacillus* оказался выше по сравнению с NPsCdS/*Shewanella* на 25–35% в зависимости от штамма. Это доказывает влияние биологической субстанции, в данном случае штаммов *B. subtilis* и *S. oneidensis*, на уровень функциональной биоцидной активности синтезированных НЧ. В [31] на примере NPsAg, полученных в присутствии трех микроорганизмов из разных таксонов, также было продемонстрировано различие в уровне антимикробной активности в отношении грам(+) и грам(–) бактерий, что подтверждает эффект влияния штаммов, использованных для получения наноматериала, на уровень ингибирующего воздействия.

*Антимикробная активность NPsCdS* установлена для большинства исследуемых штаммов, однако их восприимчивость к действию наноматериала варьирует (рис. 1, табл. 1). Среди бактериальных тест-культур наиболее чувствительными к действию НЧ обоих типов оказалась группа грам(+) бактерий с максимумами зон ингибирования, зафиксированными для *B. licheniformis* и *S. salivarius*. Из представителей грам(–) бактерий только *P. putida* оказалась чувствительной к NPsCdS. Разница в восприимчивости бактерий различных таксономических групп к действию

**Таблица 1.** Биоцидная активность NPsCdS, синтезированных с использованием *B. subtilis* 168 и *S. oneidensis* MR-1

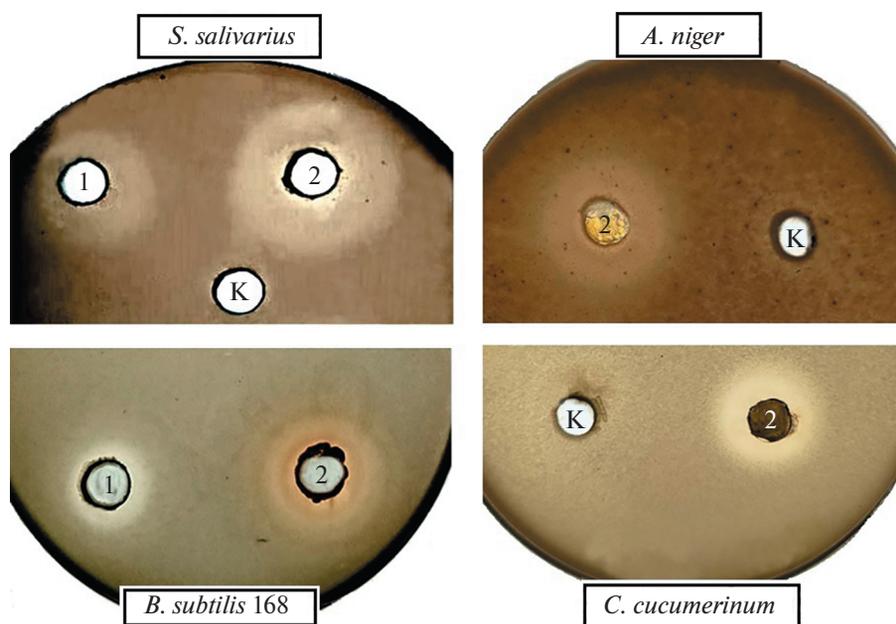
| Тест-культура                      | NPsCdS/ <i>Bacillus</i>                   | NPsCdS/ <i>Shewanella</i> |
|------------------------------------|---|---------------------------|
|                                    | Зоны ингибирования роста тест-культур, мм |                           |
| Грамм(+) бактерии                  |   |                           |
| <i>B. amyloliquefaciens</i>        | 16 ± 1                                    | 14 ± 1                    |
| <i>B. licheniformis</i>            | 28 ± 2                                    | 18 ± 2                    |
| <i>B. subtilis</i> 168             | 18 ± 1                                    | 14 ± 1                    |
| <i>E. faecalis</i>                 | 15 ± 1                                    | 12 ± 1                    |
| <i>S. epidermidis</i>              | нет                                       | нет                       |
| <i>S. salivarius</i>               | 24 ± 2                                    | 16 ± 2                    |
| <i>R. rhodochrous</i>              | 16 ± 1                                    | 12 ± 1                    |
| Грамм(-) бактерии                  |   |                           |
| <i>E. coli</i> K-12                | нет                                       | нет                       |
| <i>P. putida</i>                   | 16 ± 1                                    | 12 ± 1                    |
| <i>S. typhimurium</i>              | нет                                       | нет                       |
| <i>S. oneidensis</i> MR-1          | нет                                       | нет                       |
| Микроскопические грибы (дрожжи)    |   |                           |
| <i>C. albicans</i>                 | 14 ± 1                                    | нет                       |
| <i>S. cerevisiae</i>               | 40 ± 2                                    | 30 ± 1                    |
| Микроскопические грибы (плесневые) |   |                           |
| <i>A. niger</i>                    | 20 ± 2                                    | Не оценивали              |
| <i>C. cucumerinum</i>              | 18 ± 2                                    |                           |
| <i>F. graminearum</i>              | 16 ± 1                                    |                           |

НЧ может находить объяснение в структуре клеточной стенки микроорганизмов, определяющей проницаемость. Так, во внешней мембране грамм(-) бактерий присутствует слой липополисахаридов, препятствующий проникновению различных макромолекул и других гидрофильных молекул. Напротив, клетки грамм(+) бактерии имеют в составе многослойный пептидогликан и отрицательно заряженные глицериновые цепочки (тейхоевая кислота), притягивающие катионы металлов из раствора. Это приводит к накоплению и повышенному поглощению катионов, которые затем вызывают внутриклеточное повреждение [5, 22].

В ряде случаев устойчивость микроорганизмов к действию НЧ может определяться средой их обитания. Так, металловосстанавливающий штамм *S. oneidensis* MR-1 может существовать в условиях высокой концентрации солей металлов [18] и его устойчивость к действию NPsCdS продемонстрирована в проведенном исследовании. Показано, что для *Candida sp.* характерна природная устойчивость к катионам тяжелых металлов [32]. В настоящей работе штамм *C. albicans* показал высокий уровень устойчивости к действию NPsCdS. На примере этого штамма показательны различие антимикробного эффекта NPsCdS/*Bacillus* (зона

ингибирования 14 ± 1 мм) и отсутствие подавления роста при NPsCdS/*Shewanella*, что еще раз подтверждает важность биологической субстанции для получения наноматериала с различными характеристиками. При этом для NPsCdS наблюдается высокая активность в отношении дрожжей *S. cerevisiae*, что демонстрирует селективность ингибирования NPsCdS/*Bacillus* и NPsCdS/*Shewanella* определенных видов микроорганизмов. Полученные результаты могут лечь в основу применения биогенных NPsCdS в качестве противомикробных агентов направленного действия.

Значительный интерес представляет изучение действия НЧ на представителей микроскопических грибов (плесеней), вызывающих заболевания сельскохозяйственных культур и устойчивых к действию антибактериальных антибиотиков (рис. 1). Для исследования были выбраны штаммы: *A. niger*, вызывающий заболевания хлопчатника; *C. cucumerinum* — патоген, поражающий представителей семейства тыквенных; *F. graminearum* — возбудитель фузариозной гнили злаковых культур, кукурузы, плесени семян. Отметим, что для оценки фунгицидной активности НЧ была использована питательная среда с увеличенным содержанием агара (1.5%), что связано с от-



**Рис. 1.** Антимикробная активность на примере тест-культур грам(+) бактерий и плесневых грибов: 1 – NPsCdS/*Shewanella*, 2 – NPsCdS/*Bacillus*, К – стерильная вода.

сутствием роста культур грибов на среде с содержанием агара 0.8%, применяемой для тест-культур бактерий и дрожжей. Концентрация NPsCdS была увеличена до 8.0 мг/мл, поскольку диаметр зон ингибирования тест-культур грибов на среде с большим содержанием агара может быть уменьшен из-за снижения процесса диффузии НЧ в слой агара. В эксперименте использовали NPsCdS/*Bacillus* как более активные по антимикробным свойствам в отношении бактериальных штаммов (табл. 1). Показано, что все исследуемые виды плесневых грибов чувствительны к действию NPsCdS/*Bacillus*, среди которых наиболее восприимчивыми являются *A. niger* и *C. cucumerinum*. Полученные результаты свидетельствуют о возможности апробации биогенных NPsCdS в качестве функционального наноматериала фунгицидного действия.

**Определение элементного содержания кадмия и серы в образцах NPsCdS.** Одной из задач работы являлось определение количественного содержания элементов Cd и S в составе NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus*, концентрация которых по массе была одинаковой, 3.1 мг/мл. Установлено, что суспензия NPsCdS/*Bacillus* содержит 0.14% Cd и 0.041% S (или 1.4 мг/мл Cd и 0.41 мг/мл S) против 0.10% Cd и 0.023% S (1.0 мг/мл Cd и 0.23 мг/мл S) для NPsCdS/*Shewanella*. Таким образом, доля Cd в образцах NPsCdS/*Bacillus* превышает в 1.4 раза данный показатель для NPsCdS/*Shewanella*, при этом доля S в образце NPsCdS/*Bacillus* также увеличена.

Методом денситометрического анализа электрофореграмм было установлено различие в доле содержания белка в образцах NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus*, составившее 1.05 и 0.15 мг/мл соответственно. В перерасчете на 1 мг НЧ установлено, что образцы NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* содержат 0.34 и 0.05 мг белка соответственно. Таким образом, содержание белка в образце NPsCdS/*Shewanella* составляет ~34% от общей массы НЧ и ~5% для NPsCdS/*Bacillus*. Это свидетельствует о снижении доли белка и увеличении содержания Cd в составе образца NPsCdS/*Bacillus*.

Различие в количественном соотношении компонентов NPsCdS – доли неорганического ядра CdS и белковой фракции – может быть причиной разного уровня антимикробной активности NPsCdS/*Bacillus* и NPsCdS/*Shewanella*. Так, увеличение содержания Cd у NPsCdS/*Bacillus* может привести к повышению концентрации Cd<sup>2+</sup> и образованию АФК, что в свою очередь увеличивает уровень биоцидной активности NPsCdS/*Bacillus*. Такой вывод согласуется с другими данными о зависимости токсичности НЧ от их концентрации: чем больше концентрация НЧ, тем больше ионов высвобождается, что приводит к снижению жизнеспособности микроорганизмов [20, 30–32].

Определение роли долевого соотношения компонентов биогенных NPsCdS и связь этого параметра с уровнем их биоцидной активности имеет приоритетное значение для создания биогенного наноматериала с необходимыми свой-

ствами. Полученные результаты экспериментов свидетельствуют о возможности применения биогенных NPsCdS в качестве самостоятельных биоцидных агентов нового поколения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биогенные NPsCdS получены микробным синтезом по оптимизированной методике с использованием бактерий *S. oneidensis* MR-1 и *B. subtilis* 168. Проведена оценка влияния бактериальных штаммов на уровень биоцидной активности NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* как функциональной характеристики наноматериала в отношении грам(+), грам(–) бактерий, микроскопических грибов (дрожжей) и плесневых грибов. Показано существенное различие по величине минимальной ингибирующей концентрации NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* для тест-культуры *B. licheniformis*. Установлено, что уровень биоцидной активности NPsCdS/*Bacillus* по сравнению с NPsCdS/*Shewanella* выше на 25–35% для всех чувствительных к действию наноматериала тест-культур. Выявлена вариабельность ингибирования роста штаммов микроорганизмов наночастицами в зависимости от их таксономической принадлежности. Грам(+) бактерии и представители микроскопических плесневых грибов наиболее чувствительны к действию NPsCdS. Методами АЭС и денситометрического анализа электрофореграмм белка было продемонстрировано значительное различие в количественном соотношении доли неорганического ядра CdS и белковой фракции для NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus*. Установлено, что в составе NPsCdS/*Bacillus* увеличено содержание Cd со снижением доли белка. Следствием этого может быть повышение концентрации Cd<sup>2+</sup>, что приводит к более высокому уровню биоцидной активности NPsCdS/*Bacillus*. Доказаны важность и необходимость отбора бактериальных штаммов для создания функционально активных НЧ с необходимыми свойствами. Результаты работы подтверждают перспективность исследования биогенных NPsCdS в качестве антимикробных агентов нового поколения.

Авторы выражают благодарность Национальному биоресурсному центру – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт” за предоставление штаммов микроорганизмов. Аналитические исследования, атомно-эмиссионная спектроскопия выполнены с использованием научного оборудования ЦКП НИЦ “Курчатовский институт” – ИРЕА при финансовой поддержке проекта Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2022-1157 от 16.08.2022.

Исследование выполнено в рамках государственного задания НИЦ “Курчатовский институт” № АААА-А20-120093090016-9.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baluja Z., Nabi N., Ray A. // *EC Pharmacol. Toxicol.* 2018. V. 6. P. 865.
2. Adeniji F. // *IJPP.* 2018. V. 26. № 1. P. 85. <https://doi.org/10.1111/ijpp.12365>
3. Davis M., Whittaker A., Lindgren M. et al. // *Global Public Health.* 2018. V. 13. № 9. P. 1158. <https://doi.org/10.1080/17441692.2017.1336248>
4. Betts J.W., Hornsey M., Ragione R.M. // *Adv. Microbiol. Physiol.* 2018. V. 73. P. 123. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2018.06.001>
5. Singh P., Garg A., Pandit S. et al. // *Nanomaterials.* 2018. V. 8. № 12. P. 1009. <https://doi.org/10.3390/nano8121009>
6. Rai M., Ingle A.P., Gaikwad S. et al. // *J. Appl. Microbiol.* 2015. V. 120. № 3. P. 527. <https://doi.org/10.1111/jam.13010>
7. Teixeira M.C., Sanchez-Lopez E., Espina M. et al. // *Emerging Nanotechnologies in Immunology.* 2018. P. 233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40016-9.00009-9>
8. Wang L., Hu C., Shao L. // *Int. J. Nanomed.* 2017. V. 12. P. 1227. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
9. Yanchatuaña Aguayo O.P., Mouheb L., Revelo V.K. et al. // *Molecules.* 2022. V. 27. 458. <https://doi.org/10.3390/molecules27020458>
10. Matea C.T., Mocan T., Tabaran F. et al. // *Int. J. Nanomed.* 2017. V. 12. P. 5421. <https://doi.org/10.2147/IJN.S138624>
11. McHugh K.J., Jing L., Behrens A.M. et al. // *Adv. Mater.* 2018. V. 30. № 18. 1706356. <https://doi.org/10.1002/adma.201706356>
12. Das D., Datta A.K., Kumbhakar D.V. et al. // *J. Plant Interact.* 2018. V. 13. № 1. P. 182. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1455903>
13. Saleh T.A. // *Env. Tech. Innovat.* 2020. V. 20. 101067. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>
14. Bhat H., Ul I., Sin Y. // *Asian J. Green Chem.* 2019. V. 3. № 4. P. 455. <https://doi.org/10.33945/SAMI/AJGC.2019.4.3>
15. Skipper A., Sims J.N., Yedjou C.G. et al. // *Int. J. Env. Res. Public Health.* 2016. V. 13. № 1. P. 88. <https://doi.org/10.3390/ijerph13010088>
16. Ulloa G., Collao B., Araneda M. et al. // *Enz. Microb. Tech.* 2016. V. 95. P. 217. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.005>
17. Abdel-Salam M., Omran B., Whitehead K. et al. // *Molecules.* 2020. V. 25. № 19. P. 4486. <https://doi.org/10.3390/molecules25194486>
18. Rajput V.D., Minkina T., Kimber R.L. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2021. V. 87. № 22. <https://doi.org/10.1128/AEM.01390-21>
19. Gahlawat G., Choudhury A.R. // *RCS Adv.* 2019. V. 9. P. 12944. <https://doi.org/10.1039/C8RA10483B>

20. *Calvo-Olvera A., Donato-Capote M.D., Pool H. et al.* // J. Environ. Sci. Health. 2021. V. 56. № 6. P. 713. <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1899718>
21. *Wang L., Chen S., Ding Y. et al.* // J. Photochem. Photobiol. B. 2018. V. 178. P. 424. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.007>
22. *Alsaggaf M.S., Elbaz A.F., Badawy E.S. et al.* // Adv. Polym. Tech. 2020. V. 2020 P. 1. <https://doi.org/10.1155/2020/4909054>
23. *Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Булушова Н. В. и др.* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35. № 4. С. 151. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-4-151-156>
24. *Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Булушова Н.В. и др.* // Вопросы материаловедения. 2019. Т. 97. № 1. С. 110. <https://doi.org/10.22349/1994-6716-2019-97-1-110-119>
25. *Воейкова Т.А., Кожухова Е.И., Журавлева О.А. и др.* // Российские нанотехнологии. 2020. Т. 15. № 2. С. 194. <https://doi.org/10.1134/S199272232002020X>
26. ВКПМ. Национальный биоресурсный центр. <https://vkpm.genetika.ru/>
27. *Кулигин В.С., Журавлева О.А., Воейкова Т.А.* // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 6. С. 127. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-127-137>
28. Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар ОФС. 1.2.4.0010.18. М., 2018. 32 с.
29. *Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K.* // J. Pharm. Anal. 2016. V. 6. № 2. P. 71. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
30. *Slavin Y.N., Asnis J., Häfeli U.O. et al.* // J. Nanobio-tech. 2017. V. 15. 65. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>
31. *Alsharif S.M., Salem S.S., Abdel-Rahman M.A. et al.* // Heliyon. 2020. V. 6. 03943. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03943>
32. *Cuéllar-Cruz M., Lucio-Hernández D., Martínez-Ángeles I. et al.* // Microbiol. Biotech. 2017. V. 10. № 2. P. 405. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12485>