

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ХАЛЬКОГЕНОВ И МЕТАЛЛОВ В ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦАХ В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕНА *CLAVIBACTER SEPEDONICUS*

© 2024 г. А. И. Перфильева¹, Н. С. Забанова^{1,*}

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

*E-mail: pavnatser@mail.ru

Поступила в редакцию 26.12.2023 г.

После доработки 09.04.2024 г.

Принята к публикации 09.04.2024 г.

Представлены обобщающие данные об антибактериальном эффекте наноконкомпозитов (НК) по отношению к фитопатогенной бактерии *Clavibacter sepedonicus* (*Cms*). НК получены путем химического синтеза при погружении наночастиц (НЧ) в природную полимерную матрицу. В качестве НЧ в НК применялись как халькогены: селен и сера, так и НЧ металлов: серебро и марганец. Природной полимерной матрицей для НК являлись полисахариды: арабиногалактан (АГ), крахмал и каррагинан, а также полимеры иной природы — гуминовые вещества: лечебные грязи, угли и сланцы, полученные из различных источников в Монголии. Наиболее яркой антибактериальной активностью по отношению к *Cms* характеризовался НК Se/АГ. Данный НК обладал выраженным бактерицидным эффектом, снижал прирост бактериальной суспензии, увеличивая количество мертвых клеток в ней, обладал антибиопленочным действием. Исследования с применением методов микроскопии показали, что НЧ Se прикрепляются на поверхность *Cms*, вызывают деформацию клетки и ее дальнейшее разрушение, что может быть связано с изменениями в жирнокислотном составе бактериальной клетки под влиянием НК, а также ухудшением функционирования дегидрогеназ. НК на основе НЧ S, Ag одновременно не обладали всеми искомыми свойствами: или снижали биопленкообразование, или имели антимикробную активность. Марганецсодержащие НК обладали выраженным биологическим эффектом против *Cms* только в увеличенной концентрации. Таким образом, представленные данные позволяют рассматривать НК, особенно НК Se/АГ, в качестве эффективной альтернативы пестицидам для регуляции численности фитопатогенных бактерий.

DOI: 10.56304/S1992722323601295

ВВЕДЕНИЕ

Нанотехнологии активно внедряются в различные сферы жизни человека. Представляется перспективным использование нановеществ в области защиты растений в качестве безопасной альтернативы пестицидам, по сравнению с которыми наночастицы (НЧ) обладают более выраженным биологическим эффектом, способны обеспечивать целевое поражение мишени и используются в гораздо меньших объемах. Кроме того, большинство применяемых пестицидов обладает преимущественно фунгицидным эффектом, не оказывая негативного влияния на фитопатогены бактериальной природы. Антибактериальное действие НЧ обычно связано с их поверхностным связыванием с бактериями, высвобождением ионов с последующим возникновением сильного окислительного стресса. Одним из преимуществ использования НЧ в качестве ан-

тибактериального средства является их способность воздействовать на бактериальную клетку через несколько механизмов, что приводит к неспособности патогенов приобретать устойчивость к ним [1]. Таким образом, бактериальным клеткам становится очень трудно развивать несколько одновременных генных мутаций против обработки НЧ. Значительным недостатком препаратов на основе НЧ является их агрегативная неустойчивость. Для стабилизации НЧ создаются различные конструкции, примером которых являются наноконкомпозиты (НК) [2–8]. НК представляют собой химически синтезированные соединения НЧ халькогенов или металлов, погруженные в матрицы природного происхождения. В представленной работе приводится обобщение антибактериальных эффектов различных НК на фитопатогенную бактерию, вызывающую кольцевую гниль картофеля *Clavibacter sepedonicus*

(*Cms*), в настоящее время для регуляции численности которой отсутствуют эффективные методы.

РОЛЬ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ В АНТИБАКТЕРИАЛЬНОМ ЭФФЕКТЕ НК

Биологическая активность НК может зависеть от природы полимерной матрицы. В качестве матриц использовали различные полисахариды: арабиногалактан (АГ), каррагинан (КАР), крахмал (КР), а также полимеры иной природы — гуминовые вещества (ГВ) [2–8].

Большая часть исследуемых НК имела матрицу из АГ. АГ представляет собой полисахарид, полученный из лиственницы Сибирской *Larix sibirica* L., который обладает широким спектром биологической активности и проявляет иммуномодулирующие, митогенные, антимикробные, а также пребиотические свойства [9]. АГ принимает активное участие в растительно-микробных взаимодействиях. Молекулы АГ выделяются в составе корневых экссудатов и способствуют распознаванию ризосферными бактериями мест прикрепления к клеткам корня и его колонизации. АГ-белки структурно сложны, в изобилии встречаются во всех органах растений, включая корни, а также в корневых экссудатах [10]. На основе АГ уже созданы препараты для ростостимуляции и защиты растений. Так, получены протравители семян на основе тебуконазола в комплексе с АГ с улучшенными физико-химическими, технологическими и биологическими параметрами. Такие протравители ускоряли рост культурных растений, повышали устойчивость корневой системы к болезням и увеличивали урожайность яровой пшеницы при снижении нормы расхода действующих веществ препаратов [11]. В настоящей работе показано, что АГ *per se* не оказывает негативного влияния на рост и развитие растений картофеля *in vitro* [12], при этом активно стимулировал прирост бактериальной суспензии фитопатогена *Cms* [13]. Полученные эффекты весьма логичны в связи с тем, что АГ является полисахаридом, привлекательным в качестве пищевой базы для бактерий, секретирующих экзоферменты.

Ряд изучаемых НК синтезировали на матрице из КАР. КАР является растворимым пищевым волокном, природным сульфатированным биополимером, получаемым из бурых водорослей, состоящим из чередующихся остатков 3-О-замещенной β -D-галактопиранозы и 4-О-замещенной α -3,6-ангидро-D-галактопиранозы. Для синтеза НК использовали КАР марки WR 78 (средневесовая молекулярная масса $M_w = 1800$ кДа) (“СР Celko”, Дания). Существуют исследования биологической активности КАР по отношению к микроорганизмам. Так, известны результаты об антифитовирусной активности КАР против табачной мозаики табака и X-вируса картофеля

дурмана [14, 15]. Большинство исследований антибактериальной активности КАР проведено на патогенных для человека бактериях. Так, выявлен антибактериальный эффект КАР на следующие микробы: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium citrinum* и *Mucor* sp. [16], в составе композитов с НЧ Ag КАР также оказывал антибактериальный эффект на *E. coli*, *S. aureus* [17]. Имеются сведения об антимикробной активности в отношении бактерий *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* и *Bacillus subtilis* НК Ag и КАР [18]. В проведенном исследовании НК на основе КАР и НЧ селена (НК Se/КАР) показано, что НК Se/КАР не обладает бактериостатической и антибиопленочной активностью в отношении бактерий *Cms*, при этом исходный КАР снижает способность патогена *Cms* образовывать биопленки [3].

В связи с тем что *Cms* является организмом, паразитирующим на картофеле, в качестве матрицы для НЧ в НК использовали КР, который является наиболее предпочтительным питательным субстратом для *Cms* и относится к безопасным для человека и животных растворимым пищевым волокнам. Синтез НК селена/серы/марганца в матрице КР (НК Se/КР, НК S/КР, НК Mn(OH)₂/КР) осуществляли на основе водорастворимого КР (“Sigma-Aldrich”, США). Имеются исследования биологической активности веществ с использованием КР. Так, на основе очищенного кукурузного КР синтезировали новое биологически активное вещество — сульфаминовое производное, обладающее антимикробным эффектом в концентрации 50 мг/мл к следующим микроорганизмам: *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis* и *Streptococcus pyogenes* [19]. КР используется для создания препаратов, применяемых в медицине и ветеринарии. Например, с помощью плазменной технологии на основе НЧ Cu и Ag в комплексе с КР получен порошкообразный препарат с антибактериальным эффектом для регенерации мягких тканей [20]. Разработаны добавки к пище для кур-несушек и цыплят-бройлеров в виде йодистого крахмала [21, 22]. Таким образом, КР является хорошо зарекомендовавшим себя веществом в качестве матрицы НК. В настоящем исследовании показано, что КР *per se* не оказывает влияние на биопленкообразование *Cms* [4] и стимулирует прирост бактериальной суспензии патогена [13].

В качестве матрицы для НК иного состава также исследовали НК на основе ГВ. ГВ — это природные органические элементы, которые входят в состав почвенной влаги, почвы и полезных ископаемых. Они образуются в ходе разложения остатков растительных и животных организмов [23]. На одном из этапов разложения эти остатки минерализуются, часть их превращается в углекислый газ и воду, а все остальное — в ГВ. Эти по-

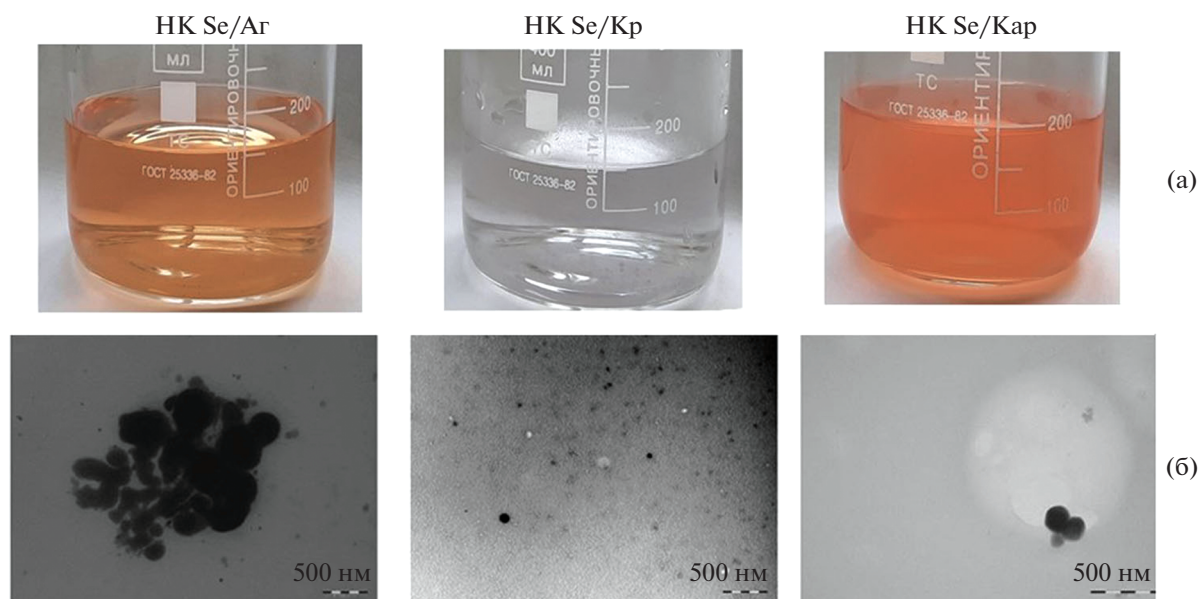


Рис. 1. Фотографии растворов НК Se в природных полимерных матрицах (а). ПЭМ-изображения НК Se в природных полимерных матрицах (б).

лимеры отличаются высокой молекулярной массой, а также сложной структурой. Каждая их молекула уникальна и индивидуальна. ГВ представляют собой смесь макромолекул переменного состава и нерегулярного строения. ГВ подразделяются на три основные составляющие (фракции): гумин — не извлекаемый остаток, нерастворимый ни в щелочах, ни в кислотах; гуминовые кислоты — фракция ГВ, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах; фульвокислоты — фракция ГВ, растворимая в щелочах и кислотах. ГВ обладают широким спектром биологической активности [24]. Структурные особенности ГВ позволяют им участвовать в разнообразных биохимических реакциях, образовывать комплексные соединения, влиять на фотохимические процессы и т.д. Кроме того, ГВ могут служить источником структурных фрагментов органических макромолекул при биосинтезе, происходящем в живых организмах. ГВ проявляют поверхностно-активные свойства как коллоидные системы [24]. Используемые ГВ выделяли щелочной экстракцией из объектов монгольских месторождений — из пелоидов (грязей) озера Гурван Нуур (ГВ–ГР), из бурых углей месторождения Багануур (ГВ–УГ) и из сланцевых рудников (ГВ–СЛ). Показано, что ГВ–УГ и ГВ–ГР не оказывали бактериостатического влияния на *Cms*, в то время как ГВ–СЛ ингибировали природную бактериальную суспензию по сравнению с контролем. По влиянию на биопленкообразование *Cms* выявлено, что ГВ–ГР значительно ингибируют этот показатель, тогда как ГВ–СЛ не оказывали эффекта, а ГВ–УГ, напротив, стимулировали биопленкообразование бактерий [25].

Таким образом, результаты, представленные в данном разделе, о влиянии матрицы на жизнедеятельность *Cms* демонстрируют, что в большей части применяемые матрицы не оказывали выраженного эффекта. Следовательно, биологическая активность НК связана с их второй составляющей — с природой НЧ, роль которой более подробно рассмотрим далее.

РОЛЬ НЧ В АНТИБАКТЕРИАЛЬНОМ ЭФФЕКТЕ НК

В работе с НК в качестве НЧ были как представители халькогенов — НЧ селена, серы, так и металлосодержащие НЧ — НЧ серебра, марганца.

НЧ селена были представлены в виде различных НК (рис. 1): НК Se/АГ, НК Se/КАР и НК Se/КР [6].

НЧ серы также были представлены в виде различных НК: НК серы и АГ (НК S/АГ) и НК серы и КР (НК S/КР) [8].

Серебросодержащие НЧ входили в состав следующих НК: НК серебра и АГ (НК Ag/АГ), НК серебра и ГВ–ГР (НК Ag/ГВ–ГР), НК серебра и ГВ–УГ (НК Ag/ГВ–УГ), НК серебра и ГВ–СЛ (НК Ag/ГВ–СЛ) [25, 26].

Марганецсодержащие НЧ были представлены в виде различных НК (рис. 2): НК гидроксида марганца и АГ (НК Mn(OH)₂/АГ), НК гидроксида марганца и КАР (НК Mn(OH)₂/КАР), НК гидроксида марганца и сульфатированного АГ (НК Mn(OH)₂/АГС) [7].

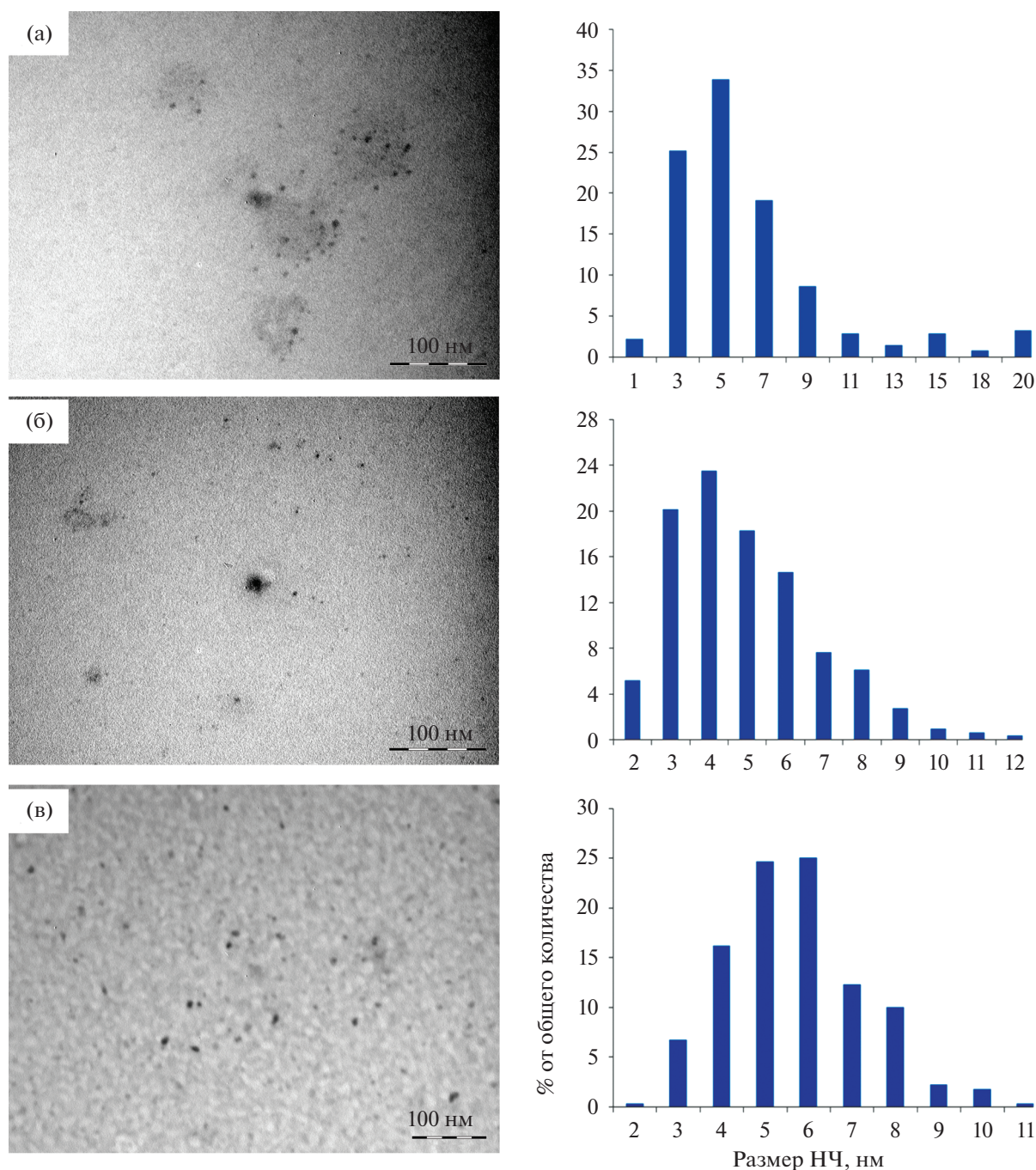


Рис. 2. ПЭМ-изображения и соответствующие распределения по размерам НЧ марганецсодержащих НК: а – НК $\text{Mn(OH)}_2/\text{AG}$, б – НК $\text{Mn(OH)}_2/\text{AGC}$, в – НК $\text{Mn(OH)}_2/\text{KAP}$.

Подтверждение наноразмеров НЧ осуществляли с применением просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (рис. 1, 2). Размеры НЧ в составе НК варьировались в зависимости от вида НЧ и составляли от 3 до 90 нм [2–8].

Рассмотрим влияние НК на такие показатели жизнеспособности бактериальной суспензии *Cms*, как прирост бактериальной суспензии, биообразование, количество мертвых клеток в су-

спензии, биохимические показатели (жирнокислотный состав клеточной стенки, мембранный потенциал), морфология бактериальной клетки.

В табл. 1 представлены сводные данные об антибактериальной активности НК. Среди халькогенсодержащих НК селенсодержащие НК обладали разнообразными антибактериальными эффектами против *Cms*, среди металлсодержащих НК – марганецсодержащие НК. Более подробно

опишем эффекты каждого вида НК в сравнении с литературными данными.

Эффект селенсодержащих НК

В литературе имеются сведения о подавлении роста бактерий *S. aureus* НЧ Se. Результаты этого исследования показывают значительное ингибирование роста золотистого стафилококка при инкубации с НЧ Se в течение 3, 4 и 5 ч при концентрации 7, 8, 15.5 и 31 мкг/мл. Доля живых бактерий также снижалась в присутствии НЧ Se [27]. Эти данные коррелируют с результатами, полученными в настоящем исследовании по подбору антибактериальных концентраций НК, согласно которому концентрация НЧ Se в НК Se/АГ, эффективная для подавления *Cms*, составляет 3 мкг/мл, что соответствует 0.000625% Se в конечном растворе. Для дальнейших экспериментов НК использовали в данной концентрации.

На первом этапе исследования бактерицидного эффекта селенсодержащих НК было показано, что в случае богатой питательной среды (имеющей легкодоступный углеводный источник — глюкозу) токсический эффект наблюдается лишь при обработке бактерий диоксидом селена — предшественником селенсодержащих НК [28]. Менее ярко выраженный токсический эффект НК Se/АГ, по-видимому, связан с тем, что на богатой питательной среде бактерии предпочитают питаться альтернативной доступной глюкозой, тогда как АГ с НЧ утилизируют в незначительном количестве, следовательно, конкурентно блокируются активная пищевая доставка и концентрирование антимикробного наноселена на микробных клетках.

В [4, 6, 25] показано, что НК Se/АГ и НК Se/КР снижали прирост бактериальной суспензии *Cms*. При этом количество мертвых клеток бактерий в образцах с НК достигало 24% по сравнению с контролем. После инкубации с НК Se изменялась морфология бактерий *Cms*, клетки укорачивались и утолщались [13]. Для визуализации результата со-инкубации *Cms* с НК Se/АГ бактериальные клетки исследовали ПЭМ. Показано, что спустя 24 ч инкубации бактериальная клетка утолщается и укорачивается, ее клеточная стенка теряет свою целостность [2, 12, 29, 30]. Разрушение клеточной стенки и мембраны бактерий под влиянием НЧ Se с использованием методов электронной микроскопии продемонстрировано на *E. coli* и *S. aureus* [31–33].

Кроме того, для исследования взаимодействия НК с *Cms* была проведена сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Было показано, что НЧ адгезируются на поверхности бактериальной клетки [29].

Механизм влияния НЧ Se на бактериальную клетку *Cms* может быть связан с воздействием на ее клеточную стенку и мембрану. Этот эффект объясняется изменением жирнокислотного состава бактериальной клетки, а также ее мембранного потенциала. Разрушение клеточной мембраны микроорганизмов часто является основной мишенью антибактериальных веществ [34, 35]. Кроме того, известно, что некоторые виды жирных кислот (ЖК) имеют большое значение для бактерий при образовании биопленок [36]. Этот факт чрезвычайно важен для возбудителя кольцевой гнили *Cms*, так как бактерии скапливаются в стеблях картофеля, вызывая их закупоривание и вилт благодаря биопленкообразованию [37]. В настоящей работе проанализировано содержание ЖК *Cms* при инкубации с НК Se (данные не опубликованы). При сравнении результатов воздействия НК Se/АГ с концентрациями Se 3.4 и 6.4% обнаружено, что НК по-разному влияют на содержание ЖК. При обработке бактерий НК Se/АГ с содержанием Se 3.4% количество ненасыщенных ЖК снижалось. Вероятно, именно это объясняет больший бактерицидный эффект НК Se/АГ 3.4% по сравнению с НК 6.4%. Известно, что для повышения устойчивости грамположительных бактерий к стрессу в их мембране увеличивается процентное содержание ненасыщенных ЖК. Это позволяет бактериям ограничивать обмен веществ, сохранять энергию и тем самым выживать [36].

Одними из важнейших функций любой бактериальной клетки, определяющей возможность ее существования, являются наличие и поддержание на определенном уровне электрического и электрохимического потенциала на ее мембране (трансмембранного потенциала, $\Delta\psi_m$), который отражает способность клеток генерировать активные формы кислорода (АФК) [38]. Для изучения влияния НК Se/АГ на $\Delta\psi_m$ клеток *Cms* использовали широко распространенный катионный липофильный краситель tetramethylrhodamine, methyl ester (TMRM) [8]. Полученные посредством флуоресцентной микроскопии данные также подтверждают выраженную бактерицидную активность НК Se/АГ против *Cms*, обусловленную исключительно НЧ Se. Практически полное подавление флуоресценции TMRM в клетках, обработанных НЧ Se, свидетельствует о падении $\Delta\psi_m$, вероятно, вследствие нарушения целостности мембраны в процессе взаимодействия ее белковых компонентов с ионами Se, продуцируемых с поверхности. Воздействие НЧ Se на клетки *Cms* сопровождается изменением проницаемости клеточной стенки для протонов H^+ , что и приводит к изменению $\Delta\psi_m$.

Таблица 1. Сводные данные по антибактериальной активности НК по отношению к *Cms*

Параметр	Халькогенсодержащие НК		Металлсодержащие НК	
	Se-содержащие НК	S-содержащие НК	Ag-содержащие НК	Mn-содержащие НК
Бактерицидный эффект	НК Se/АГ (1.23% Se) проявляет ярко выраженный эффект в физиологическом растворе и не влияет в культуральной среде (метод высева КОЕ); НК Se/КАР — зона ингибирования роста <i>Cms</i> (метод кругов); НК Se/КР — нет эффекта	НК S/КР — зона ингибирования роста <i>Cms</i> (метод кругов)	НК Ag/АГ (4.7% Ag) полная гибель клеток в ФР (метод высева КОЕ); НК Ag/АГ (2.9% Ag) — снижение КОЕ в дистиллированной воде; НК Ag/ГВ-ГР и НК Ag/ГВ-УГ — зона ингибирования роста <i>Cms</i> (метод кругов)	НК Mn(OH) ₂ /АГС — зона ингибирования роста <i>Cms</i> (метод кругов)
Бактериостатический эффект	НК Se/АГ (2.5% Se), НК Se/АГ (3.4% Se), НК Se/АГ (6.4% Se) и НК Se/КАР — снижение прироста <i>Cms</i> (метод мутности бактериальной суспензии); НК Se/КР — нет эффекта	НК S/КР — небольшое снижение прироста бактерий (метод мутности бактериальной суспензии)	НК Ag/ГВ-ГР и НК Ag/ГВ-УГ — снижение прироста <i>Cms</i> (метод мутности бактериальной суспензии)	НК Mn(OH) ₂ /АГ, НК Mn(OH) ₂ /АГ × 10 (увеличенная в 10 раз концентрация), НК Mn(OH) ₂ /АГС, НК Mn(OH) ₂ /АГС × 10 — снижение прироста <i>Cms</i> (метод мутности бактериальной суспензии)
Антибиопленочный эффект	НК Se/АГ (2.5% Se), НК Se/АГ (3.4% Se) — ярко выраженный антибиопленочный эффект; НК Se/АГ (6.4% Se) и НК Se/КР — небольшое снижение образования биопленок; НК Se/КАР — нет эффекта	Нет эффекта	НК Ag/ГВ-ГР и НК Ag/ГВ-СЛ — антибиопленочный эффект	НК Mn(OH) ₂ /АГ × 10, НК Mn(OH) ₂ /АГ × 10, НК Mn(OH) ₂ /КАР × 10 — антибиопленочный эффект
Микроскопия	НК Se/АГ (1.23% Se) — разрушение бактериальных клеток (ПЭМ); НК Se/АГ (2.5% Se), Se/АГ (3.4% Se), НК Se/КР — увеличение числа мертвых клеток в бактериальной суспензии (окрашивание красителем propidium iodide (PI)); НК Se/АГ (3.4% Se) — разрушение бактериальных клеток (ПЭМ, СЭМ)	НК S/КР — увеличение числа мертвых клеток в бактериальной суспензии (окрашивание красителем PI)	НК Ag/АГ, НК Ag/ГВ-ГР и НК Ag/ГВ-УГ — увеличение числа мертвых клеток в бактериальной суспензии (окрашивание красителем PI)	НК Mn(OH) ₂ /АГ × 10, НК Mn(OH) ₂ /АГ × 10 — увеличение числа мертвых клеток (краситель PI); НК Mn(OH) ₂ /АГС × 10, НК Mn(OH) ₂ /АГ × 10, НК Mn(OH) ₂ /КАР × 10 — разрушение бактериальных клеток (ПЭМ)
Биохимические исследования	НК Se/АГ (1.23% Se), НК Se/АГ (3.4% Se), НК Se/АГ (6.4% Se) — снижение активности дегидрогеназ; НК Se/АГ (2.5% Se) — снижение мембранного потенциала <i>Cms</i> (с применением TMRM); НК Se/АГ (1.23% Se), НК Se/АГ (3.4% Se) — изменение жирно-кислотного состава	Исследования не проводились	НК Ag/АГ (4.7% Ag) — снижение активности дегидрогеназ в дистиллированной воде	НК Mn(OH) ₂ /АГС — снижение активности дегидрогеназ

В литературе имеются несколько объяснений механизмов влияния НЧ Se на бактериальную клетку:

- прикрепление селенсодержащих НЧ к бактериальным клеткам за счет электростатических взаимодействий, что, в свою очередь, изменяет структуру бактериальной мембраны и ее проницаемость, вызывает окислительный стресс, приводящий к гибели [39];

- прямая адгезия НЧ Se к бактериальной поверхности и влияние на структурную целостность мембраны, в результате чего НЧ Se проникают в бактериальную клетку и взаимодействуют с ее внутренними компонентами (ДНК, липидами), вызывая их повреждение, кроме того, НЧ Se могут генерировать АФК и свободные радикалы, приводя к необратимому окислительному повреждению бактерий [40];

- главный механизм разрушительного влияния НЧ Se на бактериальную клетку связан не с нарушением проницаемости мембраны, а именно с генерацией АФК в бактериальной клетке под влиянием НЧ. АФК могут повреждать важные биомолекулы, такие как ДНК и липиды. Кроме того, АФК могут ингибировать выработку аденозинтрифосфата (АТФ) и репликацию ДНК, что препятствует работе встроенной системы антиоксидантной защиты клеток, и способны привести к повреждению или гибели клеток [41–47].

Различия по антибактериальному эффекту разных НК Se могут быть связаны с размером НЧ в НК. Известно, что более мелкие НЧ обладают превосходным антибактериальным действием в целом за счет увеличения площади поверхности, что приводит к пересечению барьера проницаемости мембраны [48]. Для достижения губительного для бактерий эффекта размер НЧ должен быть менее 100 нм. Высокая антибактериальная активность НЧ Se обусловлена их размером, который варьируется от 40 до 60 нм, что позволяет им легко пересекать клеточную стенку и бактериальную мембрану. Проникновение НЧ Se в клетки вызывает их лизис, препятствует синтезу АТФ, а также влияет на деление клеток, что приводит к гибели бактерии [49].

Таким образом, анализ полученных результатов о влиянии НЧ Se на жизнеспособность *Cms* и литературных данных показывает, что НЧ Se могут изменять микробную морфологию, уменьшать проницаемость микробной мембраны и приводить к окислительному стрессу благодаря генерации АФК. НЧ Se начинают свою активность, прикрепляясь к внешней поверхности микробной клетки, вызывая разрыв мембраны, образование пор и нарушение ионного транспорта. Затем мишенями НЧ Se в микробной клетке становятся ДНК, плазмиды и различные бактериальные органы [50]. Клеточная токсичность

возникает в результате окислительного стресса, созданного накоплением АФК. Наконец, в кислой среде образуются ионы Se^{+} , которые взаимодействуют с отрицательно заряженными органеллами клетки, вызывая клеточную токсичность и генотоксичность.

Влияние селенсодержащих НК на биопленкообразование фитопатогенных бактерий

Исследование влияния селенсодержащих НК на биопленкообразование *Cms* показало, что не все рассматриваемые НК обладают антибиопленочной активностью. Согласно литературным данным НК Ag/КАР обладает антибиопленочным действием по отношению к бактериям *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Материалы, содержащие подобные НК, активно применяют для упаковки пищевых продуктов [51]. Однако в исследованиях [3] НК Se/КАР не оказывает влияние на биопленкообразование *Cms*, только исходный КАР снижает способность патогена образовывать биопленки. В свою очередь, НК Se/АГ и НК Se/КР достоверно снижают биопленкообразование *Cms*, что было показано в [4, 6, 25, 29]. Антибиопленочный эффект селенсодержащих нановеществ активно исследовали на бактериях, патогенных для человека и животных [52–55]. Механизмы, которые заложены в процесс подавления биопленкообразования бактерий под влиянием НЧ Se, связывают с влиянием НЧ на экспрессию генов, образующих биопленки, и нарушением процесса кворум сенсинга (quorum sensing, QS). Считается, что НЧ Se могут снижать экспрессию генов биопленкообразования, связываясь с транскрипционными факторами и ингибируя экспрессию этих генов [56]. Кроме того, НЧ Se способны нарушать архитектуру биопленки, что также объясняется репрессией межклеточной коммуникации на трех различных уровнях за счет: ингибирования синтеза сигнальных молекул; ограничения накопления, обмена и транспорта QS-сигнала; искажения восприятия сигнала клетками и их ответа на стресс [57].

Эффект серосодержащих НК

В [5] показано, что НК S/КР обладает ярко выраженным бактерицидным эффектом и приводит к гибели клеток *Cms*. НК S/КР оказывает бактериостатическое действие на фитопатоген по сравнению с контролем и инкубацией с предшественником НК – чистым КР (рис. 3). Имеются исследования о влиянии серосодержащих НЧ на фитопатогены, но все они направлены на исследование фунгицидной активности. Показано, что комбинация НЧ S с фунгицидом бавистином может быть использована для эффективного и эко-

логически безопасного управления *Fusarium oxysporum*, вызывающего мягкую гниль имбиря [58]. Фунгицидное действие НЧ S выявлено в отношении двух фитопатогенов: *Fusarium solani*, вызывающего гниль томатов, и *Venturia inaequalis*, вызывающего паршу яблони [59]. Также было продемонстрировано, что НЧ S ингибируют рост *Aspergillus niger* и *F. oxysporum* [60].

Антибактериальный эффект НЧ S показан преимущественно на бактериях, патогенных для человека и животных [61, 62]. Положительный заряд НЧ S может способствовать связыванию НЧ с отрицательно заряженной мембраной бактериальной клетки, вызывать ее разрыв, что приводит к лизису клеточной мембраны и гибели клеток [63]. Антибактериальный механизм НЧ S также объясняют повышением процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — увеличением количества малонового диальдегида (МДА) и снижением содержания важного антиоксиданта клеток — глутатиона [61].

Эффект серебросодержащих НК

Ag и НЧ Ag являются антимикробными агентами [64]. В [26, 65] подтверждалось, что AgNO_3 значительно подавляет рост бактерий *Cms*, однако негативно влияет на биометрические показатели растений. Для устранения этого негативного влияния использовали НК на основе различных по происхождению матриц с НЧ Ag, а именно НК Ag в матрице АГ, а также в матрице ГВ трех видов. Исследования проводили преимущественно по изучению влияния НК на прирост бактериальной суспензии, интенсивность биопленкообразования бактерий и уровень их дыхательной активности.

При культивировании *Cms* на питательной среде токсический эффект НК Ag/Аг не наблюдается, тогда как при культивировании на дистиллированной воде их токсичность ярко выражена [26, 65]. Это объясняется тем, что на обедненной питательной среде отсутствуют источники углевода, и бактерии активно поглощают НК, состоящие из АГ-оболочки, в результате чего НЧ Ag также проникают в бактериальные клетки, вызывая их гибель. В питательной среде в качестве источника углевода имеется глюкоза, которая легкодоступна для бактерий, поэтому *Cms* в меньшей степени поглощают НК. НК Ag/АГ с содержанием Ag 2.9% обладал менее выраженным токсическим эффектом по сравнению с НК Ag/АГ, содержащим 4.7% Ag, который приводил к полной гибели клеток [26]. Возможно, наблюдаемый эффект связан с подавлением дыхания клеток под влиянием НК. Показано, что НК Ag/АГ, содержащий 4.7% Ag, значительно подавляет скорость поглощения кислорода клетками *Cms*. При культивировании *Cms* на питательной среде в присутствии НК не наблюдалось токсического действия ис-

следуемых НК Ag/АГ [65]. Таким образом, при выращивании *Cms* на дистиллированной воде проявлялся высокий уровень токсичности НК, что связано с активным поглощением бактериальными клетками АГ, из которого после расщепления и усвоения полисахарида высвобождались токсичные НЧ Ag. Подтверждается функциональная роль прикрепления Ag на АГ-носитель с целью более успешной доставки агента в бактериальную клетку.

Также было изучено влияние на *Cms* НК Ag в матрицах из ГВ [25]. Выбор ГВ обусловлен тем, что они представляют собой основной органический почвенный компонент, который является первичным метаболитом для большинства микробов, находящихся в почве. Исследования показали, что НК Ag/ГВ-ГР и НК Ag/ГВ-УГ обладают бактериостатическим эффектом на бактерии *Cms*. Так, в течение 48 ч они оказывают негативное влияние на рост бактерий [26]. Наблюдаемый бактериостатический эффект может быть связан с разрушением клеточной стенки бактерий, происходящим вследствие взаимодействия НЧ с ней, и последующим изменением окислительно-восстановительного потенциала клетки бактерии под влиянием НЧ. Также было показано, что НК Ag/ГВ-СЛ и НК Ag/ГВ-ГР снижают способность образования биопленок в 2 раза. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у НК Ag/ГВ-ГР и НК Ag/ГВ-УГ бактериостатических свойств и эффекта на образование биопленок в *Cms*.

Механизмы, лежащие в основе антибактериального действия НЧ металлов, в настоящий момент изучены недостаточно. Считается, что они могут быть связаны с индукцией окислительного стресса, высвобождением ионов металлов и/или неокислительными реакциями [66]. Продemonстрировано, что НЧ Ag способны проявлять свою антибактериальную активность за счет образования АФК, производства МДА и индукции утечки белков и сахаров из бактериальных клеток [67]. НЧ Ag помимо окислительного стресса способны вызывать разрушение бактериальной клетки. Так, имеются сведения о прикреплении НЧ Ag к клеточной стенке и мембране бактерий, повреждении внутриклеточных биомолекул и структур [68].

Таким образом, потенциальные механизмы НЧ Ag следующие: связывание с клеточной мембраной, мембранными белками и основаниями ДНК, что приводит к нарушению их функционирования; выделение ионов Ag^+ , воздействующих на мембраны, ДНК и белки; генерация АФК, которые также могут воздействовать на ДНК, клеточную мембрану и мембранные белки. Подавление биопленкообразования бактерий под влиянием НЧ Ag может быть связано с изменением экспрессии генов.

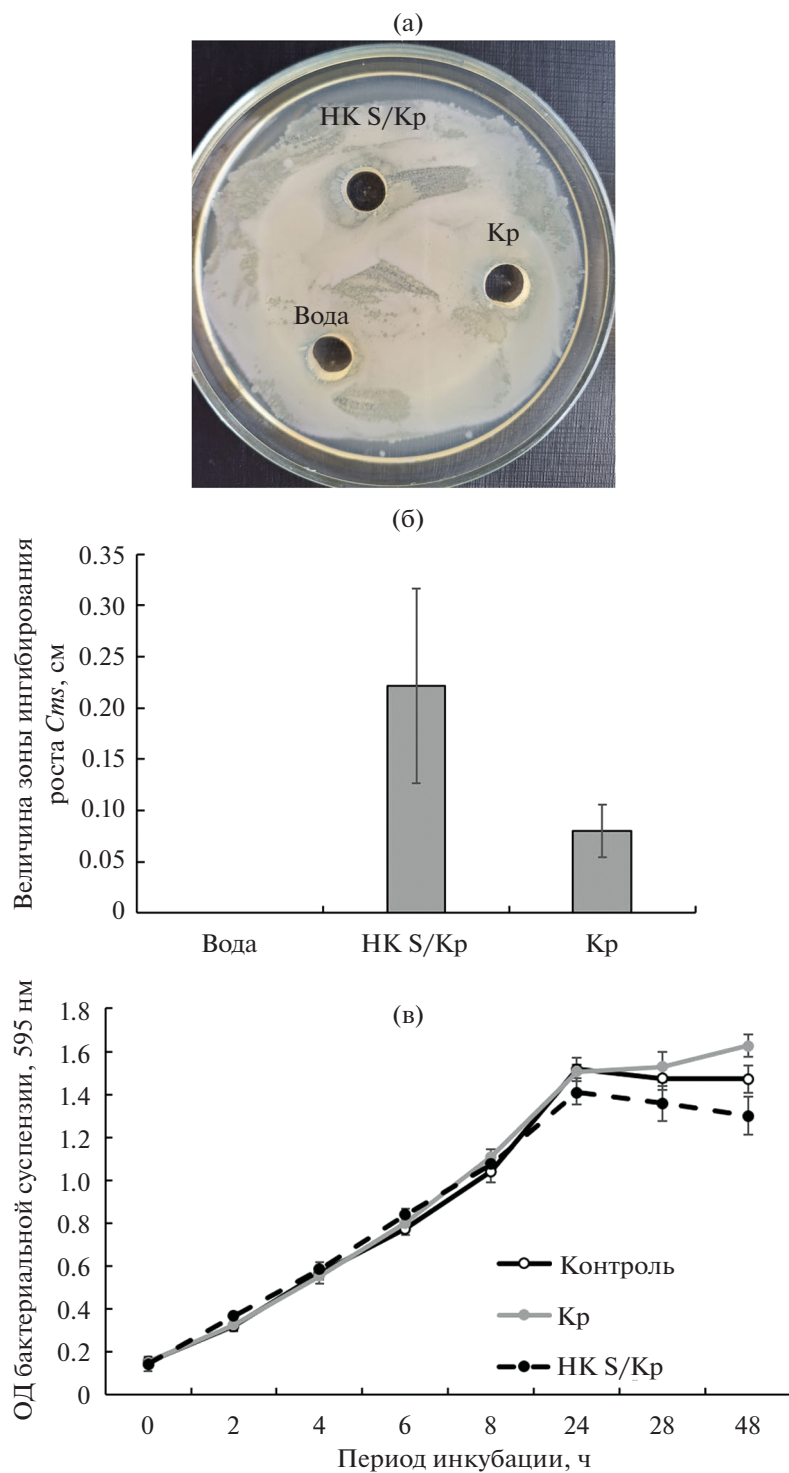


Рис. 3. Антибактериальные эффекты НК S/KP и чистого KP по отношению к *Cms*: а – ингибирование зоны роста *Cms*, показанное с применением “метода колодцев”, б – графическое изображение ингибирования зоны роста *Cms*, в – влияние НК S/KP на прирост бактериальной суспензии *Cms*.

Эффект марганецсодержащих НК

В проведенных экспериментах показано, что все марганецсодержащие НК оказывают антибактериальное действие в отношении фитопато-

генной бактерии *Cms*. Максимальное количество погибших клеток выявлено в случае НК $\text{Mn}(\text{OH})_2/\text{KAP}$ и НК $\text{Mn}(\text{OH})_2/\text{AGC}$ в увеличенной концентрации (0.00625% Mn) [7]. Похожий

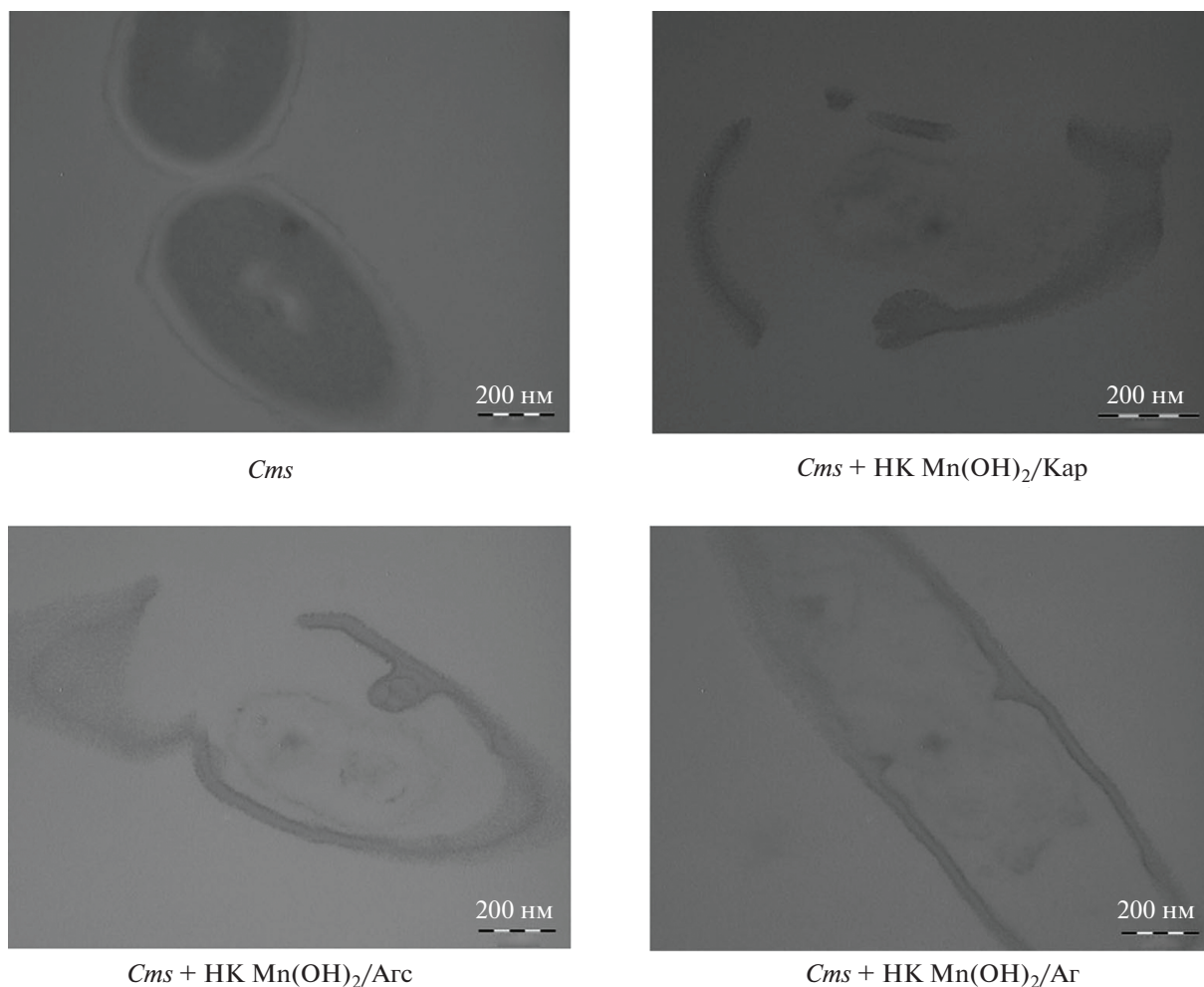


Рис. 4. ПЭМ-изображение бактерии *Cms* в контроле и спустя 24 ч инкубации с марганецсодержащими НК.

антибактериальный эффект марганецсодержащих НЧ был показан в отношении фитопатогена *Acidovorax oryzae*: НЧ MgO и MnO₂ снижали рост, биопленкообразование и подвижность бактерий [69]. Считается, что НЧ оксидов металлов обладают высокой антибактериальной активностью, которая обусловлена их небольшим размером [70]. Это дает им возможность чрезвычайно эффективно проникать в бактерии, вызывать повреждения и оказывать токсичное воздействие внутри клетки.

В [7] установлено, что НК изменяют морфологию бактериальных клеток *Cms*. После инкубации бактерий с НК в течение 1 ч клетки теряют нативную форму, их поверхность становится неровной, однако марганецсодержащие НЧ не детектируются. Вероятно, на момент регистрации НЧ не визуализируются из-за того, что они могут осаждаться при приготовлении образцов или вступать в химические реакции с компонентами клетки, успев оказать антибактериальное дей-

ствие на *Cms*. Выявлено, что после 24 ч инкубации с НК клеточные стенки бактерий разрушаются (рис. 4), содержимое клеток выбрасывается наружу, что приводит к гибели патогенных бактерий [7]. Отметим, что аналогичный процесс происходит с селенсодержащими НК и может быть связан с нарушением потенциала клеточной мембраны, вызванным присоединением к ее поверхности марганецсодержащих НЧ [29]. В [69, 71] разрушение бактерий под влиянием марганецсодержащих НЧ продемонстрировано с помощью СЭМ на примере *E. coli* и *S. aureus*. Считается, что проникновение НЧ Mn в бактериальную клетку является основным механизмом ингибирования бактерий [69, 72]. Аналогичная деформация и повреждение клеток после обработки *Ralstonia solanacearum* НЧ MgO были отмечены с использованием трансмиссионного электронного микроскопа [73].

Предлагаемый механизм антимикробного эффекта НЧ Mn включает в себя высвобождение



Рис. 5. Потенциальная схема механизмов влияния халькоген- и металлосодержащих НЧ на бактериальную клетку *Cms*.

ионов Mn^{2+} из НЧ, которые могут проходить через ионные каналы в клеточной стенке бактерии, что приводит к денатурации белков и гибели клеток [74]. Например, НЧ MnO , оказываясь вблизи отрицательно заряженной клеточной мембраны бактерий, связываются с ней из-за электростатического притяжения, что приводит к разупорядочению мембраны. В результате клеточная мембрана теряет свою проницаемость и вызывает утечку электролитов бактериальной клетки, что еще больше разрушает структуру и функциональную способность мезосом. Марганецсодержащие НЧ дополнительно реагируют с тиоловыми SH-остатками белков макромолекул, присутствующих в цитозоле, ингибируют синтез белка и подавляют активность ферментов. Такие типы вмешательств НЧ в различные клеточные органеллы нарушают внутриклеточный сигнальный процесс клетки и снижают синтез АТФ в митохондриях, что еще больше увеличивает выработку АФК, разрушая клеточные системы антиоксидантной защиты и в конечном итоге приводит к гибели клеток [75].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты демонстрируют, что биологический эффект НК в большинстве

случаев определяется не составом матрицы, а связан с природой НЧ. Среди халькогенсодержащих НК наиболее эффективным оказался НК Se/АГ, обладающий выраженными бактерицидным, бактериостатическим и антибиопленочным эффектами по отношению к *Cms*. Исследования показали, что НЧ Se, входящие в состав НК Se/АГ, прикрепляются к поверхности бактерии, нарушают жирнокислотный состав *Cms*, снижают дегидрогеназную активность, что приводит к разрушению бактериальной клетки *Cms*. В свою очередь, НК Se/КР и НК Se/КАР не обладают совокупностью искомых способностей. Так, НК Se/КР не показывает бактерицидной и бактериостатической активности по отношению к *Cms*, лишь немного снижает биопленкообразование. НК Se/КАР, напротив, уменьшает прирост бактерий и ингибирует их рост на твердой среде, при этом не подавляет биопленкообразование. Серосодержащий НК в матрице из крахмала обладает только бактерицидным и бактериостатическим эффектами.

Как и халькогенсодержащие НК, металлосодержащие НК не обладают всеми искомыми свойствами. Одни серебросодержащие НК демонстрируют бактерицидный эффект, другие — бактериостатический и антибиопленочный эффекты, снижают активность дегидрогеназ. Так, бактерицидным действием обладают НК Ag/АГ, НК Ag/ГВ—УГ и НК Ag/ГВ—ГР. При этом Ag/ГВ—УГ и НК Ag/ГВ—ГР демонстрируют бактерицидное влияние. Снижение биопленкообразования наблюдали только у НК Ag/ГВ—СЛ и НК Ag/ГВ—ГР. НК на основе НЧ Mn проявляют антибактериальные эффекты только в увеличенной концентрации. НК $Mn(OH)_2$ /АГС оказался наиболее эффективным из исследованных марганецсодержащих НК по отношению к *Cms*. При этом исследования с применением микроскопии не идентифицировали НЧ Mn на поверхности бактериальных клеток, что, вероятно, объясняется малыми размерами НЧ Mn в составе марганецсодержащих НК. С помощью микроскопии показано, что все марганецсодержащие НК приводят к полному разрушению бактериальной клетки.

Механизмы влияния всех исследуемых НЧ согласно полученным данным и литературным носят сходный характер (рис. 5), при этом НЧ оксидов металлов благодаря своим малым размерам имеют более выраженный эффект. На первом этапе НЧ взаимодействуют с бактериальной клеткой благодаря электростатическому притяжению, прикрепляясь к ней. Затем происходит изменение мембранной проницаемости клетки, что вызывает утечку электролитов, нарушение функционирования транспортных структур в мембране. Согласно литературным данным НЧ проникают внутрь бактериальной клетки, однако мы не обнаружили НЧ в клетке, они концентрировались лишь на ее поверхности. В литературе име-

ются сведения, что НЧ влияют на экспрессию генов, вызывают окислительный стресс и ПОЛ, что приводит к потере целостности клетки и ее гибели. Наблюдается нарушение биопленкообразования бактерий под влиянием НЧ, которое связано с изменением экспрессии генов, ответственных за чувство кворума бактерий.

Таким образом, можно заключить, что НК, в особенности НК Se/АГ, являются перспективными агентами для регуляции численности фитопатогенной бактерии *Cms* благодаря наличию разнообразных антибактериальных механизмов в их действии.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках базового проекта “Изучение молекулярных механизмов физиологических процессов и аллелопатии в растительно-микробных отношениях” (программы № 0277-2021-0004 (121031300011-7)). Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hernández-Díaz J.A., Garza-García J.J., León-Morales J.M. et al.* // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 5929. <https://doi.org/10.3390/molecules26195929>
2. *Папкина А.В., Перфильева А.И., Живетьев М.А. и др.* // *Российские нанотехнологии*. 2015. Т. 10. № 5–6. С. 130.
3. *Ножкина О.А., Перфильева А.И., Граскова И.А. и др.* // *Российские нанотехнологии*. 2019. Т. 14. № 5–6. С. 74. <https://doi.org/10.21517/1992-7223-2019-5-6-74-81>
4. *Перфильева А.И., Ножкина О.А., Третьякова М.С. и др.* // *Российские нанотехнологии*. 2020. Т. 15. № 1. С. 108. <https://doi.org/10.1134/S199272232001015X>
5. *Lesnichaya M., Gazizova A., Perfileva A. et al.* // *IET Nanobiotechnol.* 2021. V. 15. № 7. P. 585. <https://doi.org/10.1049/nbt2.12044>
6. *Perfileva A.I., Nozhkina O.A., Ganenko T.V. et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 9. P. 4576. <https://doi.org/10.3390/ijms22094576>
7. *Khutsishvili S.S., Perfileva A.I., Nozhkina O.A. et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 21. P. 12006. <https://doi.org/10.3390/ijms222112006>
8. *Lesnichaya M., Perfileva A., Nozhkina O. et al.* // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2022. V. 69. P. 126904. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126904>
9. *Буторина Н.В., Коновалова А.Ю.* // Тез. Докл. Всерос. науч.-практич. конф. “Научные исследования студентов в решении актуальных проблем АПК”, Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского (Молодежный), 28–29 марта 2019. С. 90.
10. *Ngueta-Ona E., Coimbra S., Vicré-Gibouin M. et al.* // *Ann. Bot.* 2012. V. 110. № 2. P. 383. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs143>
11. *Халиков С.С., Теплякова О.И., Власенко Н.Г. и др.* // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2015. Т. 23. № 5. С. 591. <https://doi.org/10.15372/KhUR20150513>
12. *Папкина А.В., Перфильева А.И., Живетьев М.А. и др.* // Докл. РАН. 2015. Т. 461. № 2. С. 239. <https://doi.org/10.7868/S0869565215030305>
13. *Перфильева А.И., Ножкина О.А., Граскова И.А. и др.* // Изв. РАН. Сер. хим. 2018. № 1. С. 157.
14. *Reunov A., Nagorskaya V., Lapshina L. et al.* // *J. Plant Diseases Protect.* 2004. V. 111. P. 165. <https://doi.org/10.1007/BF03356143>
15. *Нагорская В.П., Реунов А.В., Лапшина Л.А. и др.* // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 6. С. 756.
16. *Wang F., Yao Z., Wu H. et al.* // *Appl. Mech. Mater.* 2011. V. 108. P. 194. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.108.194>
17. *Vishnuvarthanan M., Rajeswari N.* // *J. Food Sci. Technol.* 2019. V. 56. № 5. P. 2545. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03735-4>
18. *Лесничая М.В., Александрова Г.П., Феоктистова Л.П. и др.* // Изв. РАН. Сер. хим. 2010. № 12. С. 2266.
19. *Ахедов О.Р., Шомуротов Ш.А., Раханова Г.Г. и др.* // *Химия растительного сырья*. 2016. № 3. С. 19. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2016031092>
20. *Бабушкина И.В., Гладкова Е.В., Пучиньян Д.М.* // *Современные проблемы науки и образования*. 2016. № 5. С. 33.
21. *Гаврикова Л.М.* // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2007. № 6 (32). С. 29.
22. *Булгаков А.М., Гаврикова Л.М.* // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2007. № 3 (29). С. 47.
23. *Van Rensburg C.E.* // *Phytother. Res.* 2015. V. 29. № 6. P. 791. <https://doi.org/10.1002/ptr.5319>
24. *Савченко И.А., Корнеева И.Н., Лукаш Е.А. и др.* // Журнал Медиа. 2019. № 1 (23). С. 54. <https://doi.org/10.21145/2225-0026-2019-1-54-60>
25. *Граскова И.А., Перфильева А.И., Ножкина О.А. и др.* // *Химия растительного сырья*. 2019. № 3. С. 345. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019034794>
26. *Перфильева А.И., Граскова И.А., Ножкина О.А. и др.* // *Российские нанотехнологии*. 2019. Т. 14. № 9–10. С. 85. <https://doi.org/10.21517/1992-7223-2019-9-10-85-93>
27. *Tran P.A., Webster T.J.* // *Int. J. Nanomed.* 2011. V. 6. P. 1553. <https://doi.org/10.2147/IJN.S21729>

28. Перфильева А.И., Папкина А.В., Боровский Г.Б. и др. // Изв. вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2013. Т. 2. № 5. С. 52.
29. Перфильева А.И., Мотылева С.М., Клименков И.В. и др. // Российские нанотехнологии. 2017. Т. 12. № 9–10. С. 90.
30. Лесничая М.В., Малышева С.Ф., Белогорлова Н.А. и др. // Изв. РАН. Сер. хим. 2019. № 12. С. 2245.
31. Liu W., Golshan N.H., Deng X. et al. // *Nanoscale*. 2016. V. 8. P. 15783. <https://doi.org/10.1039/C6NR04461A>
32. Wang Q., Barnes L.M., Maslakov K.I. et al. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2021. V. 121. P. 111859. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111859>
33. Li W., Song P., Xin Y. et al. // *Int. J. Nanomedicine*. 2021. V. 16. P. 1849. <https://doi.org/10.2147/IJN.S295928>
34. Shen S., Zhang T., Yuan Y. et al. // *Food Control*. 2015. V. 47. P. 196. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.003>
35. Mingeot-Leclercq M.P., Décout J.L. // *Med. Chem. Commun.* 2016. V. 7. P. 586. <https://doi.org/10.1039/C5MD00503E>
36. Dubois-Brissonnet F., Trotier E., Briandet R. // *Front. Microbiol.* 2016. V. 28. № 7. P. 1673. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01673>
37. Eichenlaub R., Gartemann K.H. // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011. V. 49. P. 445. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>
38. Hermansen S., Linke D., Leo J.C. // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2022. V. 128. P. 113. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.07.002>
39. Elakraa A.A., Salem S.S., El-Sayyad G.S., Attia M.S. // *RSC Adv.* 2022. V. 12. № 41. P. 26603. <https://doi.org/10.1039/d2ra04717a>
40. Dang-Bao T., Ho T.G., Do B.L. et al. // *ACS Omega*. 2022. V. 7. № 40. P. 36037. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05469>
41. Huang T., Holden J.A., Heath D.E. et al. // *Nanoscale*. 2019. V. 11. № 33. P. 14937. <https://doi.org/10.1039/c9nr04424h>
42. Tran P.L., Hammond A.A., Mosley T. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 3586. <https://doi.org/10.1128/AEM.02683-08>
43. Zhao G., Wu X., Chen P. et al. // *Free Radical Biol. Med.* 2018. V. 126. P. 55. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.017>
44. Zhuang Y., Li L., Feng L. et al. // *Nanoscale*. 2020. V. 12. P. 1389. <https://doi.org/10.1039/C9NR09039H>
45. Makabenta J.M.V., Nabawy A., Li C.H. et al. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. V. 19. P. 23. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0420-1>
46. Stoimenov P.K., Klinger R.L., Marchin G.L., Klambunde K.J. // *Langmuir*. 2002. V. 18. P. 6679. <https://doi.org/10.1021/la0202374>
47. Ramalingam B., Parandhaman T., Das S.K. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2016. V. 8. P. 4963. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b00161>
48. Riyal I., Badoni A., Kalura S.S. et al. // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2023. V. 30. № 7. P. 19269. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23550-3>
49. Gunti L., Dass R.S., Kalagatur N.K. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 931. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00931>
50. Nastulyavichus A., Kudryashov S., Smirnov N. et al. // *Appl. Surf. Sci.* 2019. V. 469. P. 220. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.11.011>
51. Goel A., Meher M.K., Gupta P. et al. // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 206. P. 854. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.033>
52. Ghada M.K., Bahig A.E. // *LWT-Food Sci. Technol.* 2015. V. 63. P. 1001.
53. Geoffrion L.D., Hesabizadeh T., Medina-Cruz D. // *ACS Omega*. 2020. V. 5. № 6. P. 2660. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03172>
54. Cremonini E., Zonaro E., Donini M. et al. // *Microb. Biotechnol.* 2016. V. 9. № 6. P. 758. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12374>
55. Shakibaie M., Forootanfar H., Golkari Y. et al. // *J. Trace Elem. Med. Bio.* 2015. V. 29. № 1. P. 235. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.07.020>
56. Behbahani S.R., Iranbakhsh A., Ebadi M. et al. // *PLoS One*. 2020. V. 15. № 7. P. e0235556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235556>
57. Gómez-Gómez B., Arregui L., Serrano S. // *Metallomics*. 2019. V. 11. № 6. P. 1104. <https://doi.org/10.1039/c9mt00044e>
58. Athawale V., Paralakar P., Ingle A.P., Rai M. // *IET Nanobiotechnol.* 2018. V. 12. № 8. P. 1084. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5086>
59. Rao K.J., Paria S. // *RSC Adv.* 2013. V. 3. № 26. P. 10471. <https://doi.org/10.1039/C3RA40500A>
60. Choudhury S.R., Ghosh M., Mandal A. et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 90. № 2. P. 733. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3142-5>
61. Xi J., An L., Huang Y. et al. // *Small*. 2021. V. 17. № 13. P. e2005473. <https://doi.org/10.1002/smll.202005473>
62. Hashem N.M., Hosny A.E.M.S., Abdelrahman A.A., Zakeer S. // *AIMS Microbiol.* 2021. V. 7. № 4. P. 481. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021029>
63. Shankar S., Pangen R., Park J.W., Rhim J.W. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2018. V. 92. P. 508. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.015>
64. Долмаа Г., Александрова Г. Биологическая активность гуминовых веществ и их нанокомпозитов. Саарбрюккен: LAP Lambert Academic Publishing, 2017. 256 с.
65. Перфильева А.И., Ножкина О.А., Александрова Г.П. и др. // Российские нанотехнологии. 2021. Т. 16. № 4. С. 564. <https://doi.org/10.1134/S1992722321040087>
66. Wang X., Zhang D., Pan X. et al. // *Chemosphere*. 2017. V. 170. P. 266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.020>

67. Yuan Y.G., Peng Q.L., Gurunathan S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 3. P. 569.
68. Ivask A., Kurvet I., Kasemets K. et al. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 7. P. e102108.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108>
69. Ogunyemi S.O., Zhang F., Abdallah Y. et al. // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2019. V. 47. № 1. P. 2230.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1622552>
70. Saod W.M., Hamid L.L., Alaallah N.J., Ramizy A. // *Biotechnol. Rep. (Amst)*. 2022. V. 34. P. e00729.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00729>
71. Akhtar S., Rehman S., Almessiere M.A. et al. // *Nano-materials (Basel)*. 2019. V. 9. № 11. P. 1635.
<https://doi.org/10.3390/nano9111635>
72. Raghupathi K.R., Koodali R.T., Manna A.C. // *Langmuir*. 2011. V. 27. P. 4020.
<https://doi.org/10.1021/la104825u>
73. Cai L., Chen J.N., Liu Z.W. et al. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 790.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00790>
74. Lu H., Zhang X., Khan S.A. et al. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 761084.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.761084>
75. Khan S.A., Shahid S., Shahid B. et al. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 5. P. 785.
<https://doi.org/10.3390/biom10050785>