

ДЕНИСЕНКО С. Р.[✉], БОРОВА М. М., БУЗІАШВІЛІ А. Ю., ЄМЕЦЬ А. І.

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а, ORCID: 0009-0005-9497-3931, 0000-0003-2255-8032, 0000-0002-8283-5401, 0000-0001-6887-0705

[✉] densviat@gmail.com, 0930400454

РОЗРОБКА МЕТОДУ БІОФАБРИКАЦІЇ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА ОСНОВІ *BACILLUS SUBTILIS* ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ВПЛИВУ НА *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

Мета. Розробити підходи щодо синтезу наночастинок срібла за використання бактерії *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn та перевірити їх токсичність щодо непатогенної ґрунтової мікрофлори, зокрема бактерії *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita et al.) Abe et al. (Approved Lists). **Методи.** У роботі використовували мікробіологічні методи, методи культивування *in vitro* та дифузії в агар, а також метод статистичного аналізу даних. Проведено «зелений» синтез наночастинок срібла за використання матриці, створеної на основі *B. subtilis*. **Результати.** Продemonстровано можливість позаклітинного синтезу Ag-вмісних наночастинок за використання штаму В-7099 *B. subtilis*. Встановлено, що вміст Ag в синтезованих наночастинках складає приблизно 66 %. Виявлено, що концентрації синтезованих Ag-вмісних наночастинок, які є ефективними проти патогенних мікроорганізмів, проявляють значно нижчу токсичність щодо непатогенних ґрунтових бактерій, зокрема *C. glutamicum*. **Висновки.** Враховуючи здатність *B. subtilis* підвищувати стійкість рослин до ряду фітопатогенів, а також можливість синтезу Ag-вмісних наночастинок на їх основі з вираженою біологічною активністю, розробка нанобіотехнологічних підходів щодо захисту рослин від різних захворювань є перспективним напрямком досліджень.

Ключові слова: «зелений» синтез, наночастинки срібла, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, токсичність, *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita et al.) Abe et al. (Approved Lists).

Останнім часом нанобіотехнології дедалі активніше застосовують в агропромисловості, пропонуючи безпечнішу альтернативу пестицидам, які спричиняють резистентність і шкодять довкіллю. Наночастинки, завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям, відкривають нові можливості у біотехнології рослин,

забезпечуючи захист від стресів і фітопатогенів та підвищення врожайності як альтернатива агрохімікатам [1, 2]. Особливий інтерес викликають Ag-, Cu-, Fe-вмісні та біметалічні наночастинки, які здатні взаємодіяти з біологічними молекулами та демонструють високий антимікробний потенціал [2, 3]. Ag-вмісні наночастинки (AgНЧ), як відомо, мають антибактеріальну та фунгіцидну дію, а також підвищують частоту проростання насіння, прискорюють ріст та розвиток рослин, підвищують вміст хлорофілів [1–5]. У комплексному підході до захисту рослин, який поєднує різні методи, особливу увагу приділяють застосуванню препаратів на основі бактерій, що стимулюють ріст рослин (PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria) [6], зокрема *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, потенціал якої вважається недооціненим [7]. Наразі відомо, що різні штами *B. subtilis* застосовують як біосурфактанти та агенти боротьби з патогенами рослин [8]. Бактерії виду *B. subtilis* здатні синтезувати антимікробні пептиди, бактеріоцини, ліпопротеїни, літичні ферменти та ін. [7, 8]. Було встановлено антимікробну дію *B. subtilis* проти патогенних грибів роду *Fusarium* та деяких бактерій, зокрема представників родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas* [9] та *Phytophthora* [10].

Враховуючи зазначене, «зелений» синтез чи так звана біофабрикація Ag-вмісних наночастинок за використання *B. subtilis* є перспективним напрямом, оскільки поєднання їх біоактивних властивостей може дати синергічний ефект, збільшуючи ефективність та безпечність. Отже, метою даної роботи була розробка методики синтезу наночастинок срібла за використання матриці, створеної на основі бактерії *B. subtilis*, для подальшого їх застосування для захисту рослин від патогенів, а також перевірка токсичності синтезованих наночастинок щодо нецільових мікроорганізмів, зокрема непатогенної бак-

терії *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita et al.) Abe et al. (Approved Lists).

Матеріали і методи

Вирощування *B. subtilis* і отримання матриці для синтезу $AgHCl$. Грам-позитивну бактерію *Bacillus subtilis* (штам В-7099) культивували в рідкому живильному середовищі Поживний бульйон (Фармактив, Україна), до складу якого входили: 4,5 г/л хлориду натрію; 10 г/л пептону; 0,5 г/л дріжджового екстракту, рН $-7,3 \pm 0,2$. Бактерію вирощували за температури $37^\circ C$ протягом 48 год на шейкері. Далі нарощену культуру центрифугували в пробірках (Eppendorf, США), протягом 10 хв при 8000 об./хв, мікроцентрифуга (MiniSpin Eppendorf, США), надосадову рідину (супернатант) відбирали та використовували як матрицю для біологічного синтезу наночастинок.

Синтез $AgHCl$. До отриманої матриці об'ємом 20 мл додавали різні концентрації $AgNO_3$ (1–25 мМ) об'ємом 5 мл та культивували протягом 24 год за температури $30^\circ C$ при постійному перемішуванні. Оптимальною для синтезу $AgHCl$ виявилась концентрація 1 мМ $AgNO_3$. При проведенні синтезу візуально оцінювали стан розчину (відсутність кристалічного осаду, однорідність). Надалі отриманий зразок пропускали крізь нітроцелюлозний фільтр Millipore (США) (діаметр пор 0,45 мкм) для очищення і стерилізації для проведення подальших аналізів. Зразки наночастинок зберігали при температурі $+4^\circ C$.

Методом енергодисперсійної спектроскопії (ЕДС) визначали процентний вміст елементів у полі зору, ширина якого становила 70–150 нм, залежно від ділянки зразка. Реєстрацію інтенсивності рентгенівського випромінювання елементів здійснювали за допомогою спектрометру JED-2300T (Японія).

Токсичність $AgHCl$ щодо бактерії *Corynebacterium glutamicum*. Перевірку токсичного впливу $AgHCl$ досліджували за використання методу дифузії в агар [11]. Для цього, нічну культуру бактерії *C. glutamicum* IFBG В-216, вирощену у середовищі LB (10 г/л пептону (#1616, Conda, Іспанія), 5 г/л дріжджового екстракту (#1616, Conda, Іспанія), 10 г/л NaCl), розбавляли до $OD_{600}=0,1$ та інокулювали «газоном» на агаризованому середовищі LB. Стерильні диски фільтрувального паперу ($d=5,5$ мм) викладали на інокульовану поверхню, на диски

наносили по 10 мкл розчинів наночастинок (5, 25, 50, 75, 100, 125 мкг/мл), а також контроль – матрицю (супернатант). Чашки Петрі з дисками інкубували 24 год у термостаті за температури $28^\circ C$, після чого аналізували діаметр зон затримки росту навколо дисків фільтрувального паперу з нанесеними на них різними концентраціями наночастинок. Для цього чашки Петрі фотографували, а діаметр зон затримки росту вимірювали на цифрових фотографіях за допомогою програмного пакета ImageJ.

Статистична обробка даних. Кожен дослід проводили у 3-кратній повторності. Статистичну достовірність підтверджували за використання t-критерію Ст'юдента для 5 % рівня значущості.

Результати та обговорення

Синтез та аналіз складу $AgHCl$. У результаті проведеної серії експериментів синтезовано наночастинок срібла, мікрокомпонентний склад яких досліджено за допомогою методу ЕДС. Встановлено, що вміст Ag у них складає приблизно 66 %, окрім срібла було ідентифіковано інші елементи, такі як Na, K, Si, Cl. Наявність цих хімічних елементів пов'язана з особливостями процесу біологічного синтезу наночастинок, оскільки вони є складовими реакційного середовища, у якому формувалися наночастинок. Зміна кольору розчину зі світло-жовтого до темно-коричневого відбувалася через 24 год і була надійною ознакою формування наночастинок срібла, що узгоджується з роботою [12]. При цьому бактеріальний супернатант (матриця) діяв як відновник і стабілізуючий агент через присутність певних бактеріальних ферментів, що опосередковують синтез наночастинок.

Дослідження токсичності синтезованих $AgHCl$. У результаті проведеного дослідження було виявлено, що порівняно з матрицею (позитивний контроль), $AgHCl$ у діапазоні концентрацій 5–125 мкг/мл пригнічували ріст бактерії *C. glutamicum* (рис. 1, 2). Найнижча антибактеріальна активність була характерна для $AgHCl$ у концентрації 5 мкг/мл – діаметр зон затримки росту *C. glutamicum* був приблизно 7,93 мм, а для матриці (супернатанту) діаметр зон затримки росту становив 6,74 мм (рис. 1, 2). Максимальну затримку росту *C. glutamicum* спостерігали за дії 25 мкг/мл $AgHCl$ – діаметр зони затримки росту становив 13,76 мм, для концентрацій 50, 75, 100 та 125 мкг/мл діаметр

був приблизно 12,82 мм, 13,42 мм, 11,78 мм та 12,47 мм (рис. 1, а, рис. 2). Отримані нами дані узгоджуються з результатами, описаними у роботі [10].

Слід зазначити, що нещодавно нами було встановлено ефективну фунгістатичну дію синтезованих за використання штаму В-7099 *B. subtilis* AgНЧ на культуру міцелію фітопатогенного гриба *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary [13]. *P. infestans*, як відомо, є небезпечним грибним фітопатогеном, який викликає фітофтороз у таких важливих сільськогосподарських культур, як томати і картопля, тому пошук ефективних засобів захисту цих культур від фітофторозу є вкрай актуальним завданням. Разом з цим важливо також проводити перевірку впливу нових засобів боротьби з фітопатогенами на нецільові організми, щоб розуміти рівень безпе-

ки їх подальшого застосування. Тож при порівнянні дії синтезованих нами AgНЧ на ґрунтову непатогенну бактерію *C. glutamicum* виявлено, що їх токсичність в аналогічних концентраціях є суттєво нижчою, ніж на *P. infestans*.

Потенціал ендоефітних мікроорганізмів, до яких належать *B. subtilis*, був показаний раніше з точки зору їх здатності пригнічувати патогени рослин, комах і нематод [12]. Дані мікроорганізми, а також різні види РГРВ, відіграють важливу роль у прискоренні появи сходів, стимулюванні росту рослин, підвищують резистентність до стресових чинників і сприяють пристосуванню рослин за несприятливих умов навколишнього середовища. Показано, що вони запобігають розвитку захворювань за допомогою опосередкованого ними *de novo* синтезу, наприклад антигрибних метаболітів.

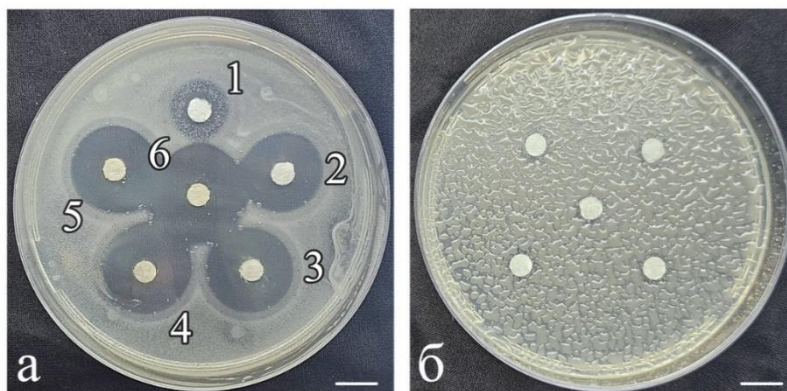


Рис. 1. Вплив AgНЧ, синтезованих за допомогою матриці на основі штаму В-7099 бактерій *B. subtilis* (а) у концентрації 5, 25, 50, 75, 100, 125 мкг/мл (1–6 відповідно), а також контрольного розчину супернатанта (матриці), нанесеного на диски (б) на *C. glutamicum*; Масштаб: 1 см.

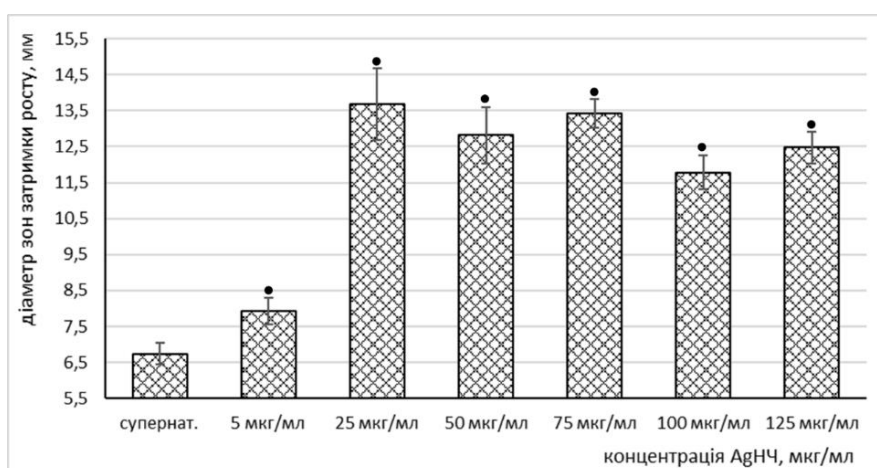


Рис. 2. Діаметр зон затримки росту *C. glutamicum* навколо дисків, на які наносили AgНЧ, синтезовані за допомогою матриці на основі штаму В-7099 бактерій *B. subtilis*, у концентрації 5, 25, 50, 75, 100, 125 мкг/мл, а також супернатант (позитивний контроль). Крапкою позначена достовірність $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Крім того, бактерії і, зокрема *B. subtilis*, мають потенціал для використання в біогенному синтезі наночастинок з різними характеристиками та бажаними властивостями для різноманітних застосувань. Біологічно опосередкований синтез наночастинок за допомогою *B. subtilis* має певні переваги, оскільки вони можуть адсорбувати метали та продукувати ферменти, які використовуються як відновники для їх синтезу. Таким чином, дані бактерії можуть слугувати ефективними біологічними «фабриками» для синтезу наночастинок срібла [6, 12, 13, 15] з антипатогенними властивостями, що є надзвичайно перспективним з точки зору підвищення стійкості та продуктивності рослин.

Висновки

Вперше використано штам В-7099 *B. subtilis* та розроблено методику позаклітинного «зеленого» синтезу наночастинок срібла. Виявлено, що концентрації AgНЧ, які є ефективними проти патогенних мікроорганізмів, проявляють значно нижчу токсичність щодо непатогенних ґрунтових бактерій, зокрема *C. glutamicum*. Враховуючи здатність *B. subtilis* підвищувати стійкість рослин до ряду фітопатогенів, а також можливість синтезу AgНЧ на їх основі з вираженою біологічною активністю, розробка нанобіотехнологічних підходів щодо захисту рослин від різних захворювань є перспективним напрямком досліджень.

Роботу виконано частково за фінансової підтримки НАН України (бюджетна програма КПКВК 6541030, 2024–2028 рр., державний реєстраційний номер: 0124U002424).

References

1. Duhan J. S., Kuma, R., Kumar N., Kaur P., Nehra K., Duhan S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnol. Rep.* 2017. Vol. 15. P. 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.03.002>.
2. Bahrulolum H., Nooraei S., Javanshir N., Tarahimofrad H., Mirbagheri V. S., Easton A. J., Ahmadian G. Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector. *J. Nanobiotechnol.* 2021. Vol. 19 (1). 86. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00834-3>.
3. Ndaba B., Roopnarain A., Haripriya R. A. M. A., Maaza, M. Biosynthesized metallic nanoparticles as fertilizers: An emerging precision agriculture strategy. *J. Integr. Agric.* 2022. Vol. 21 (5). P. 1225–1242.
4. Siddiqi K. S., Husen A., Rao R. A. K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J. Nanobiotechnol.* 2018. Vol. 16 (1). 14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>.
5. Sami F., Siddiqui H., Hayat S. Impact of Silver Nanoparticles on Plant Physiology: A Critical Review. Eds. S. Hayat, J. Pichtel, M. Faizan, Q. Fariduddin. *Sustainable Agriculture Reviews*. Springer, 2020. Vol. 41. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33996-8_6.
6. Meena M., Swapnil P., Divyanshu K., Kumar S., Harish, Tripathi Y. N., Zehra A., Marwal A., Upadhyay R. S. PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. *J. Basic Microbiol.* 2020. Vol. 60 (10). P. 828–861. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000370>.
7. Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. *J. Nat. Prod.* 2019. Vol. 82 (7). P. 2038–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>.
8. Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10. 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>.
9. Todorova S., Kozhuharova L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 26 (7). P. 1207–1216. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0290-1>.
10. Wang Y., Zhang C., Wu L., Wang L., Gao W., Jiang J., Wu Y. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* WL-2 and its Iturin A lipopeptides against *Phytophthora infestans*. *bioRxiv* 2019. 751131. <https://doi.org/10.1101/751131>.
11. Buziashvili A., Cherednichenko L., Kropyvko S., Yemets A. Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020. Vol. 25. 101602. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101602>.
12. Ibrahim E., Fouad H., Zhang M., Zhang Y., Qiu W., Yan C., Li B., Mo J., Chen J. Biosynthesis of silver nanoparticles using endophytic bacteria and their role in inhibition of rice pathogenic bacteria and plant growth promotion. *RSC Adv.* 2019. Vol. 9. P. 29293–29299. <https://doi.org/10.1039/C9RA04246F>.
13. Buziashvili A., Borova M., Yemets, A. Fungistatic activity of silver nanoparticles obtained using *Bacillus subtilis*. *Mater. IV Int. Sci. Pract. Internet Conf.* 2024. P. 171–173. [in Ukrainian]
14. Alsamhary K. I. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus subtilis* and their antibacterial activity. *Saudi J. Biol. Sci.* 2020. Vol. 27 (8). P. 2185–2191. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.026>.
15. Yu X., Li J., Mu D., Zhang H., Liu Q., Chen G. Green synthesis and characterizations of silver nanoparticles with enhanced antibacterial properties by secondary metabolites of *Bacillus subtilis* (SDUM301120). *Green Chem. Lett. Rev.* 2021. Vol. 14 (2). P. 190–203. <https://doi.org/10.1080/17518253.2021.1894244>.

DENYSENKO S. R., BOROVA M. M., BUZIASHVILI A. Yu., YEMETS A. I.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevetskogo str., 2a*

DEVELOPMENT OF THE BIOFABRICATION METHOD OF SILVER NANOPARTICLES BASED ON *BACILLUS SUBTILIS* AND STUDY OF THEIR EFFECT ON *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

Aim. To develop approaches for the synthesis of silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn bacteria and to evaluate their toxicity against non-pathogenic soil microflora, particularly the bacterium *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita et al.) Abe et al. (Approved Lists). **Methods.** The study employed microbiological methods, in vitro cultivation techniques, agar diffusion assays, and statistical data analysis. A “green” synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) was carried out using a matrix created from *B. subtilis*. **Results.** The possibility of extracellular AgNP synthesis using the *B. subtilis* B-7099 strain was demonstrated. It was found that the Ag content in the synthesized nanoparticles is approximately 66 %. It was revealed that AgNP concentrations effective against pathogenic microorganisms exhibit significantly lower toxicity against non-pathogenic soil bacteria, particularly *C. glutamicum*. **Conclusions.** Considering the ability of *B. subtilis* to enhance plant resistance to a range of phytopathogens, as well as the possibility of synthesizing AgNPs based on them with pronounced biological activity, the development of nanobiotechnological approaches for protecting plants from various diseases is a promising area of research.

Keywords: “green” synthesis, silver nanoparticles, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, toxicity, *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita et al.) Abe et al. (Approved Lists).