

УДК 544:77

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА В МАТРИЦЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

© Д.А. Панов*, А.М. Кацев, А.В. Омельченко

*Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, пр. Академика
Вернадского, 4, Симферополь, 295007, (Россия), e-mail: panovda@cfuv.ru*

Нанобиокомпозит селена получали путем восстановления селенита натрия в водных растворах альгинат-хитозановых полиэлектролитных комплексов. Морфологические, размерные и спектральные характеристики полученных наночастиц изучали методами УФ-спектроскопии и просвечивающей электронной микроскопии при различных соотношениях компонентов (0.01–0.10). Было установлено, что нанобиокомпозит селена состоит из одиночных наночастиц размером порядка 40 нм, преимущественно сферической или вытянутой формы. Частичная замена альгината хитозаном привела к значительному повышению стабильности композита и увеличению сроков хранения до 3 месяцев.

Биотоксические свойства синтезированного нанобиокомпозита селена изучали с использованием биотестирования на морских люминесцентных тест-бактериях *Aliivibrio fischeri* F1. Было установлено, что нанобиокомпозит селена не оказывал ингибирующего действия на биолюминесценцию и рост тест-бактерий и не обладал ни острой, ни хронической биотоксичностью. Селенит натрия, который использовался для сравнения, напротив, подавлял свечение и рост *A. fischeri* F1 и проявлял как острую, так и хроническую биотоксичность.

При исследовании биологических свойств полученных селеносодержащих наноструктур было установлено повышение энергии прорастания и всхожести семян гороха (*Pisum sativum* L.) сорта «Мадонна» и ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта «Кузен», а также увеличение массы сухого вещества корней и надземной части. Высокая активность ростовых процессов исследуемых культур отмечена при концентрации наноселена 20 мг/л.

Ключевые слова: альгинат, хитозан, наноселен, полиэлектролитный комплекс, семена гороха и ячменя, биотоксичность, тест-бактерии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Совета Министров Республики Крым в рамках научного проекта № 19-44-910003 p_a.

Введение

В последние десятилетия интерес ученых к микроэлементу селену не ослабевает. Он жизненно важен для человека и животных. Селен участвует в антиоксидантной защите организма, активизирует гормоны щитовидной железы, входит в состав ферментов, избавляющих организм от избытка перекисей и свободных радикалов, обладает противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью и защищает организм от действия тяжелых металлов. Недостаток селена в организме вызывает целый ряд заболеваний человека и животных, в том числе бронхиальную астму и сердечно-сосудистые заболевания. Следует отметить, что между содержанием селена во внешней среде и частотой поражения населения онкологическими и инфекционными заболеваниями существует обратно пропорциональная зависимость. Таким образом, наночастицы селена могут быть использованы для предупреждения возникновения и лечения опухолей и вирусных инфекций [1–3]. Поэтому появляется необходимость восполнения дефицита селена в организме путем введения в рацион биологически активных добавок, содержащих производные селена. Чаще всего это селенат или селенит натрия. Однако эти соли недостаточно эффективны, являются токсичными и могут вызывать нега-

Панов Денис Александрович – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры общей химии, e-mail: panovda@cfuv.ru

Кацев Андрей Моисеевич – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии, e-mail: katsev@mail.ru

Омельченко Александр Владимирович – кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий, e-mail: omelchenko_tnu@mail.ru

затом, наночастицы селена могут быть использованы для предупреждения возникновения и лечения опухолей и вирусных инфекций [1–3]. Поэтому появляется необходимость восполнения дефицита селена в организме путем введения в рацион биологически активных добавок, содержащих производные селена. Чаще всего это селенат или селенит натрия. Однако эти соли недостаточно эффективны, являются токсичными и могут вызывать нега-

* Автор, с которым следует вести переписку.

тивные явления [4, 5]. Весьма обосновано повышенное внимание ученых к биологическим свойствам наночастиц селена (Se^0). В отличие от ионных форм наноразмерный селен обладает повышенной биодоступностью, антиоксидантной активностью и более низкой токсичностью. Наночастицы селена в сравнении с антибиотиками способны оказывать свое действие постоянно [6–10].

Среди многочисленных методов получения наночастиц селена преобладают химические методы восстановления ионов селена в растворах восстановителей. В качестве восстановителей используют аскорбиновую кислоту, тиомочевину, боргидрид натрия, аминокислоту L-цистеин и другие. В этом случае образуются микрочастицы размером 100 и более нм, обладающие сильно развитой межфазной поверхностью, что приводит к быстрой агрегации и потере химической и биологической активности. Для повышения агрегативной устойчивости наночастиц восстановление ионных соединений селена проводят в присутствии различных стабилизаторов. С этой целью чаще всего используют синтетические полимеры: полиэтилен, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон и другие [11, 12]. В настоящее время все возрастающий интерес вызывают водорастворимые природные полисахариды: пектин, хитозан, альгинат натрия, арабиногалактан, которые отличаются от синтетических полимеров биосовместимостью с живыми системами, меньшей токсичностью. К числу основных можно отнести морские полисахариды – альгинат натрия (АН) и хитозан (ХТ), которые обладают широким спектром биологической активности и находят применение в медицине, биотехнологии, пищевой промышленности и сельском хозяйстве [13, 14].

Развитие полимерной науки заключается в создании биосистем на основе противоположно заряженных электролитов. Совместное использование катионных и анионных полимеров позволяет получать интерполимерные полиэлектролитные комплексы, в течение длительного времени сохраняющие высокую химическую и биологическую активность. Отрицательно заряженный альгинат реагирует с положительно заряженным хитозаном с образованием полиэлектролитного комплекса (ПЭК). Согласно литературным данным, альгинат-хитозановые комплексы в зависимости от соотношения ХТ: АН могут образовывать ПЭК двух типов: водорастворимые (нестехиометричные) и водонерастворимые (стехиометричные). Водонерастворимый альгинат-хитозановый комплекс образуется, как правило, при эквимольных соотношениях (в пересчете на функциональные группы), а в остальных случаях – частично растворимые [15–17]. Ранее проведенные исследования показали, что полностью растворимые комплексы образуются при ХТ : АН, равным 0.1 : 0.9 (рН 6.8) или 0.9 : 0.1 (рН 4.5) [15, 17]. Водонерастворимые альгинат-хитозановые комплексы находят широкое применение в медицине для создания новых лекарственных препаратов [18, 19], в качестве сорбционных материалов для очистки воды от тяжелых металлов и нефтепродуктов [20]. Водорастворимые ПЭК использовали для охлаждения гидробионтов [21]. Эти комплексы обладают рядом ценных свойств по сравнению с индивидуальными полисахаридами. Они обладают более устойчивым стабилизирующим эффектом, что связано с большим количеством межмолекулярных связей [15, 16, 22]. Использование водорастворимых альгинат-хитозановых комплексов для стабилизации наночастиц металлов и неметаллов, полученных химическим восстановлением ионов, недостаточно изучено и, несомненно, представляет научный и практический интерес.

Целью настоящей работы явилось изучение процесса образования и агрегативной устойчивости наночастиц селена в низкоконтрированных водорастворимых альгинат-хитозановых полиэлектролитных комплексах, а также исследование биологических и токсических свойств полученных селеносодержащих наноструктур.

Экспериментальная часть

Наночастицы селена получали путем химического восстановления селенита натрия, «ч.» (Россия) аминокислотой L-цистеином («Synex Pharma», Китай). Стабилизацию полученных частиц осуществляли растворами природных полисахаридов: низковязкий альгинат натрия («Algogel 3001», Франция) и водорастворимый низкомолекулярный хлорид хитозана (ЗАО «Биопрогресс», Россия) со степенью дезацетилирования 75%. Характеристическую вязкость полисахаридов $[\eta]$ определяли экстраполяционным методом из концентрационных зависимостей от приведенной вязкости. Измерения проводили на вискозиметре Оствальда с диаметром капилляра 0.56 или 0.73 мм при температуре 23 °С, повторность измерений не менее 3 раз и разница в отсчетах не превышала 2 сек. В качестве фонового электролита для альгината натрия использовали 0.10 М раствор хлорида натрия, для хитозана – ацетатный буферный раствор (0,33М уксусной кислоты и 0.30 М ацетата натрия) [13, 15–17]. Различные партии альгината могут отличаться вязкостью, молекулярной мас-

сой, соотношением гулурановой и маннурановой кислот. Эти различия оказывают существенное влияние на загущающую и гелеобразующую способность полисахарида. Соотношение кислот определяли ИК-спектроскопическим методом. Маннурановая кислота характеризуется на ИК-спектре полосой поглощения валентных колебаний пиранозного кольца при 809 см^{-1} , а наличие гулурановой кислоты – 776 см^{-1} [23]. ИК-спектры поглощения были сняты в области $4000\text{--}500\text{ см}^{-1}$ на ИК-Фурье-спектрометре фирмы PerkinElmer Spectrum Two (США). Определения содержания аминогрупп в хитозане и свободных карбоксильных групп в альгинате проводили методом кислотно-основного титрования на иономере Экотест 2000-Т (Россия) с комбинированным стеклянным электродом «Эком-рН-ком», $\Delta\text{pH} = \pm 0.01$. Общее содержание ионогенных групп в альгинате определяли потенциометрическим титрованием раствором хитозана. Поскольку восстановление селенита натрия цистеином происходит в нейтральной или слабокислой среде, то для повышения агрегативной устойчивости образующихся наночастиц использовали водорастворимый нестехиометричный полиэлектролитный комплекс на основе альгината и хитозана с массовым соотношением концентраций $C_{\text{ХТ}}:C_{\text{АН}} \leq 0.1$ [15–17]. Низкоконцентрированные растворы селеносодержащих наноструктур готовили следующим образом: навеску хитозана 0.012 г растворяли в 100 мл дистиллированной воды, добавляли альгинат массой 0.125 г , тщательно перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения альгината. К полученному альгинат-хитозановому комплексу постепенно добавляли цистеин (0.031 г) и селенит натрия (0.011 г), всю смесь перемешивали в течение 30 минут . Массовую концентрацию селена в полученном растворе определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрометра высокого разрешения с источником сплошного спектра и электротермической атомизацией *contrAA® 800 G* («Analytik Jena AG», Германия). Массовое соотношение селена и полисахаридов (v) изменялась в интервале от 0.01 до 0.10 . После введения всех компонентов раствора селеносодержащие структуры необходимо выдержать в течение $3\text{--}4$ дней.

В результате окислительно-восстановительной реакции селенита натрия с цистеином в присутствии полиэлектролитного комплекса альгината и хитозана образовывался коллоидный раствор аморфного наноселена красного цвета. Спектры поглощения растворов индивидуальных веществ, альгинат-хитозанового комплекса и нанобиокомпозиата селена регистрировали с помощью псевдо-двухлучевого сканирующего спектрофотометра Shimadzu UV-1280 (Япония) в рабочем диапазоне длин волн $\lambda=200\text{--}500\text{ нм}$, в кварцевых кюветах с фотометрическим слоем 1 см при температуре $23\text{ }^\circ\text{C}$. Калибровку базовой линии проводили по дистиллированной воде.

Для определения размеров и форм образовавшихся наноструктур селена методом просвечивающей электронной микроскопии была выбрана система, полученная при массовом соотношении селена и полисахаридов $v=0.04$. Съемка образца производилась на трансмиссионном электронном микроскопе G2 Spirit BioTWIN (Нидерланды), при ускоряющем напряжении 120 кВ , в светлопольном режиме. Образцы монтировались на опорную медную сетку с формваровой пленкой-подложкой.

Агрегативную устойчивость селеносодержащих наноструктур контролировали физико-химическими методами. Растворы сохраняли в закрытых колбах при комнатной температуре вдали от прямых солнечных лучей. Измерения вязкости, рН и оптической плотности (при 2-кратном разбавлении) проводили ежедневно в течение четырех месяцев.

В работе использовали достаточно хорошо апробированную в мире методику оценки острой токсичности по ингибированию бактериальной биолюминесценции (ISO 11348-1:2007). Для этого бактерии выращивали в лабораторных условиях и подготавливали для анализа, как было описано ранее [25]. Образцы наноконпозиата селена вносили в пробы для биотестирования, содержащие 3% NaCl, 0.02 М фосфатный буферный раствор, с $\text{pH}=7.2$. При необходимости дополнительной корректировки рН пробы подтитровывали 10% -м раствором HCl до $\text{pH}=7.0\pm 0.2$. Для определения острой биотоксичности в полученные, как описано выше, пробы добавляли заранее подготовленную суспензию бактерий до конечной концентрации 10^6 кл/мл . Интенсивность биолюминесценции бактерий в пробах регистрировали в течение 60 мин с помощью люминометра БЛМ-8801 (СКТБ Наука, Россия). Результаты измерений представляли в $\%$ от контрольных значений биолюминесценции проб, полученных без введения образцов наноселена и заменой их на соответствующие объемы 3% NaCl.

Для оценки хронической биотоксичности использовали модификацию методики, описанной в работе [28]. Методика нашла широкое применение в научных исследованиях и получила название «spot test». Для ее проведения пробы, подготовленные, как описано выше, для теста на острую биотоксичность, после внесения люминесцентных бактерий выдерживали 24 ч при $25\text{ }^\circ\text{C}$. Отбирали по 10 мкл каждой пробы и

наносили их в виде капель на поверхность плотной питательной среды (на чашках Петри), после чего инкубировали еще 18–24 ч при 25 °С. Контрольные пробы содержали только бактерии в среде для биотестирования, без внесения препаратов селена. Через 18 и 24 ч чашки Петри с плотной питательной средой анализировали визуально, сравнивая зоны бактериального роста и затем регистрировали фотографически.

С целью выяснения биологической активности синтезированных нанобиокомпозитов селена был использован для определения ростовых показателей семян культурных растений гороха (*Pisum sativum* L.) сорта «Мадонна» и ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта «Кузен». Семена гороха и ячменя замачивали в течение 4 часов в растворе нанокомпозита селена с концентрацией 10, 20 и 30 мг/л (по селену). Контролем служили семена, замоченные в дистиллированной воде в течение 4 ч. Затем семена помещали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри и проращивали в климатической камере «Binder» (Германия) при температуре 24 °С и относительной влажности воздуха 60±5 в течение 7 дней. Энергию прорастания и всхожесть семян определяли на 3, 5 и 7 сутки. Биомассу сухого вещества корней и надземной части проростков определяли гравиметрическим методом. Для определения биомассы растительный материал фиксировали в течение 5 мин при 110 °С и доводили его до постоянной массы при 60 °С. Объем выборки составлял 30 семян в трехкратной повторности для каждого варианта. Эксперименты проводили в трехкратной биологической повторности, статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартной методике [22].

Результаты и обсуждения

Вискозиметрическим методом были определены характеристические вязкости альгината натрия $[\eta]=4.20$ дл/г и хитозана $[\eta]=1.30$ дл/г. Небольшие значения характеристической вязкости говорят о том, что данные полисахариды относят к низковязким и водорастворимым. Такие полисахариды наиболее пригодны для получения устойчивых водорастворимых ПЭК. Методом потенциометрического титрования определили содержание свободных карбоксильных групп в альгинате – 10 масс.% и аминокрупп в хитозане – 6 масс.%. Согласно полученным данным ИК-спектроскопии, отношение маннуриновой и гулуриновой кислот составляет 1.04 : 1.00. Следовательно, данный альгинат образует средней силы и плотности гели. Благодаря диссоциации карбоксильных групп маннуриновой и гулуриновой кислот, альгинат в растворе проявляет полианионные свойства. Хитозан в слабокислых растворах проявляет поликатионные свойства. Согласно литературным данным и ранее проведенным исследованиям, при смешивании эквимольных растворов полисахаридов (в пересчете на ионогенные группы) за счет электростатического взаимодействия карбоксильных групп альгината и аминокрупп хитозана образуются полиэлектролитные комплексы. Ранее было установлено, что водорастворимый альгинат-хитозановый комплекс образуется при замещении небольшого количества (около 10 масс.%) альгината хитозаном [15, 17]. По данным атомно-абсорбционной спектроскопии массовая концентрация селена составляла 0.05 г/л.

Наночастицы селена получали путем восстановления селенита натрия цистеином в присутствии водорастворимого альгинат-хитозанового комплекса. Согласно работам А.П. Суздалева и Р.В. Валуевой, процесс образования наноструктур является достаточно сложным, состоящим из нескольких стадий: образование зародышевых частиц, адсорбция органических стабилизаторов на их поверхности и последняя стадия – упорядочивание в полимерной матрице и уплотнение полученной наноструктуры [11, 12, 24]. Что касается нашей системы, то первая стадия – образование наночастиц селена – восстановление селенита натрия цистеином протекает достаточно быстро (в процессе перемешивания раствор окрашивается в характерный оранжево-красный цвет). Процессы адсорбции макромолекул полисахаридов и их взаимодействие с поверхностью наночастиц селена являются сложными, и какой из параметров будет оказывать наибольшее влияние на формирование нанобиокомпозита, ответить затруднительно. Экспериментально было установлено, что для стабилизации образующихся наночастиц от их агрегации необходимо 3–4 дня. В этот период уменьшается рН и вязкость дисперсной среды, которые определяют стабильность наночастиц.

На рисунке 1 представлены оптические спектры поглощения растворов индивидуальных веществ (альгината и хитозана), альгинат-хитозанового комплекса и полученного нанобиокомпозита селена.

В исследуемом диапазоне длин волн ($\lambda=200-500$ нм) альгинат (рис. 1, 1), хитозан (2) и водорастворимый альгинат-хитозановый комплекс (3) практически не поглощают кванты света. На кривой 4, соответствующей спектру поглощения селеносодержащей наноструктуре наблюдается четко выраженный небольшой пик при длине волны 256 нм. Согласно литературным данным, этот пик свидетельствует об обра-

зовании наночастиц селена [11, 12]. Исследование полученного нанокомпозита селена методом просвечивающей электронной микроскопии показало, что образец состоит из одиночных частиц, преимущественно сферической и реже эллипсоидальной формы (рис. 2).

На микрофотографии наносистемы видно, что частицы селена находятся в разрозненном виде, не слипаются в конгломераты. Наибольшая частота размеров исследуемых частиц лежит в диапазоне 25–70 нм и составляет 75%. Однако попадаются относительно крупные стержневидные и асимметричные частицы (чуть более 100 нм), и численная доля их не превышает 10%. Средний размер наночастиц селена 40 нм. Согласно ранее проведенным исследованиям, влияние массового соотношения селен : полисахарид была определена область насыщения адсорбционной емкости, влияющей на процесс формирования и морфологические характеристики наноструктур. По данным УФ-спектроскопии, вискозиметрии и рН-метрии эта область соответствует диапазону массовых соотношений (ν) от 0.02 до 0.08 [22]. В настоящей работе был использован нанобиокомпозит селена с массовым соотношением $\nu=0.04$.

Ранее проводимые исследования показали, что альгинат натрия является стабилизатором наночастиц селена, полученных в результате восстановления селенит иона цистеином. Однако через 3 недели наблюдалась агрегация наночастиц и выпадение их в осадок [13]. Водорастворимый альгинат-хитозановый комплекс отличается от индивидуального альгината по своим адсорбционным свойствам. Этот комплекс обеспечивает более устойчивый стабилизирующий эффект за счет большего количества межмолекулярных связей и наличия в структуре взаимопроникающих сеток. По данным проведенных измерений оптической плотности, вязкости и рН данная система оставалась стабильной в течение трех месяцев, о чем свидетельствовало отсутствие значительных изменений физико-химических характеристик наночастиц. Следует отметить, что после выпадения в осадок селен не менял свою модификацию [22].

В настоящее время наряду с синтезом наночастиц селена, поиском эффективных стабилизаторов, существует острая необходимость оценки токсических свойств селеносодержащих наноструктур и воздействие их на людей и живые организмы.

Биотоксические свойства полученных наночастиц селена изучали с использованием биотестов на основе люминесцентных морских бактерий *Aliivibrio fischeri* F1, выделенных из Черного моря. Большое количество исследований показало перспективность применения этого тест-штамма для биоаналитических целей [25–27].

Изучение биотоксического действия образцов селена проводилось с использованием биотеста на морских светящихся бактериях. Показателем токсичности в таких тестах является, как правило, ингибирование биолюминесценции более, чем на 20% или 50% [29]. В работе изучали синтезированный наноселен, а также селенит натрия, который использовался для сравнения.

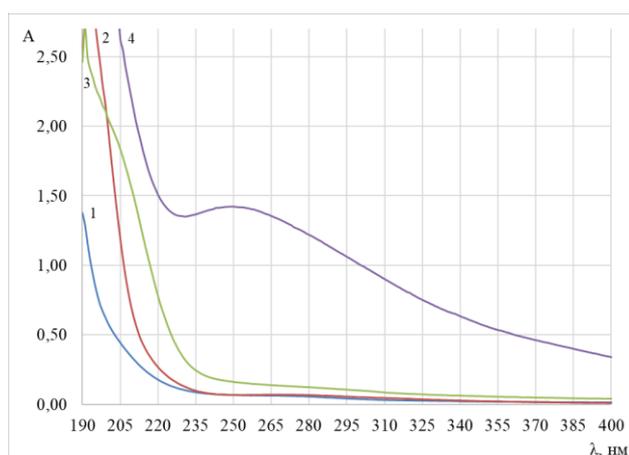


Рис. 1. Спектры поглощения полисахаридов и нанобиокомпозита селена. 1 – альгинат натрия; 2 – хитозан; 3 – ПЭК; 4 – нанобиокомпозит селена



Рис. 2. ПЭМ микрофотография нанобиокомпозита селена ($\nu=0.04$)

Действие селенита натрия на биолюминесценцию *A. fischeri* F1 представлено на рисунке 3. При концентрациях до 100 мг/л (по селену) значительного изменения интенсивности бактериального свечения не отмечалось. Дальнейшее увеличение концентрации образца приводило к ингибированию биолюминесценции, которое усиливалось при увеличении времени инкубации бактерий с селенитом от 15 мин до 60 мин. В качестве количественной характеристики биотоксичности селенита натрия были рассчитаны значения концентрации образца, которые вызывали снижение интенсивности бактериального свечения на 50% ($ЭК_{50}$). Так, для времени инкубации 15, 30 и 60 мин, $ЭК_{50}$ в мг/л составили 820, 640 и 420 (в пересчете на Se), что свидетельствует об усилении биотоксичности во времени.

Следует отметить наличие двухфазного характера действия селенита натрия на люминесцентные тест-бактерии, что может быть следствием проявления эффекта *hormesis* [30]. В области низких концентраций образца наблюдалось незначительное увеличение биолюминесценции бактерий до 115%, которое затем переходило в ингибирование при более высоком содержании селенита.

Подготовка наночастиц селена для биотестирования показала, что введение фосфатного буферного раствора и 3%-го хлорида натрия не приводит к нарушению дисперсности проб, которые оставались прозрачными в течение всего времени эксперимента.

Для определения хронической биотоксичности образцы, содержащие селенит натрия, выдерживали с тест-бактериями в течение 24 ч, после чего их высевали на плотную питательную среду. Эксперименты показали, что в присутствии селенита натрия происходит изменение характеристик бактериального роста, снижается плотность бактериальной массы в зонах роста, уменьшается их пигментация (исчезает желтое окрашивание, характерное для бактерий *A. fischeri* F1). При концентрации Na_2SeO_3 более 300 мг/л рост тест-бактерий полностью подавлялся (рис. 4, А). Полученные данные свидетельствуют о частичной или полной гибели бактериальных клеток в присутствии селенита натрия, что является проявлением хронической биотоксичности и биоцидности.

Острое действие нанобиокомпозиата селена на свечение *A. fischeri* F1 показано на рисунке 5. В течение 60 мин образцы наноселена не оказывали значительного влияния на бактериальную биолюминесценцию, что свидетельствует об отсутствии или низких значениях биотоксичности. Интенсивность свечения тест-бактерий оставалась близкой к 100% и не зависела от концентрации наночастиц и времени биотестирования (наблюдаемые отклонения биолюминесценции в пределах $\pm 10\%$ не считались значимыми [29]).

Изучение хронической биотоксичности нанобиокомпозиата селена показало, что в области исследуемых концентраций (до 40 мг/мл, что являлось максимально возможной концентрацией по селену в условиях проводимых экспериментов) значительных изменений характеристик роста тест-бактерий *A. fischeri* F1 не происходит (рис. 4, Б). При этом не были отмечены и такие характерные признаки, как подавление роста, снижение плотности бактериальной массы, потеря пигментации, которые наблюдались при исследовании Na_2SeO_3 (рис. 5). Полученные данные можно интерпретировать как отсутствие хронической биотоксичности и биоцидности образцов нанобиокомпозиата селена.

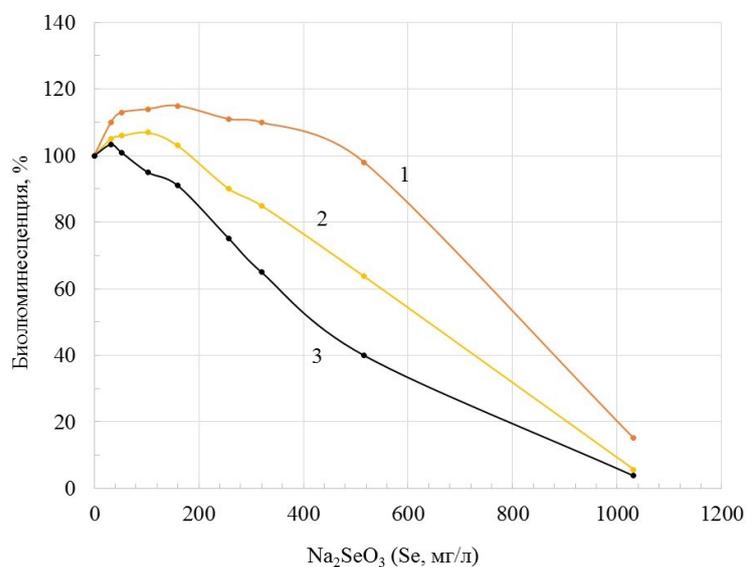


Рис. 3. Действие селенита натрия на биолюминесценцию тест-бактерий *A. fischeri* F1 при времени инкубации: 1 – 15 мин; 2 – 30 мин; 3 – 60 мин

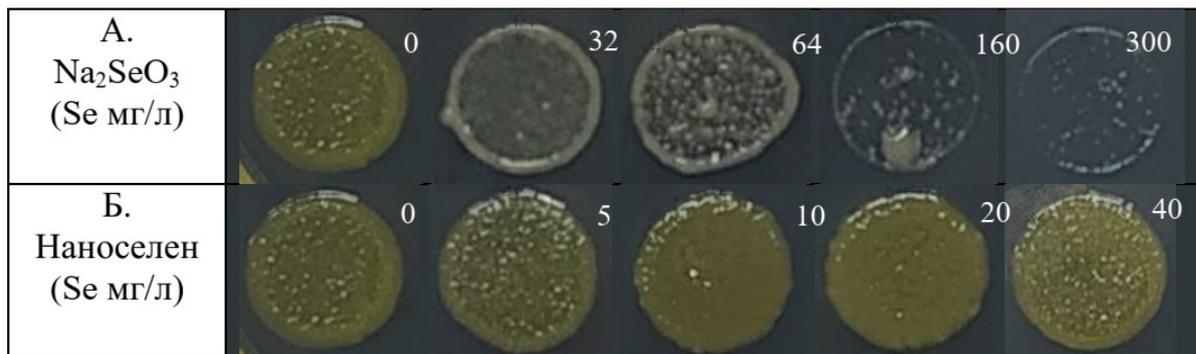


Рис. 4. Зоны роста бактерий *A. fischeri* F1 в присутствии селенита натрия (А) и наноселена (Б)

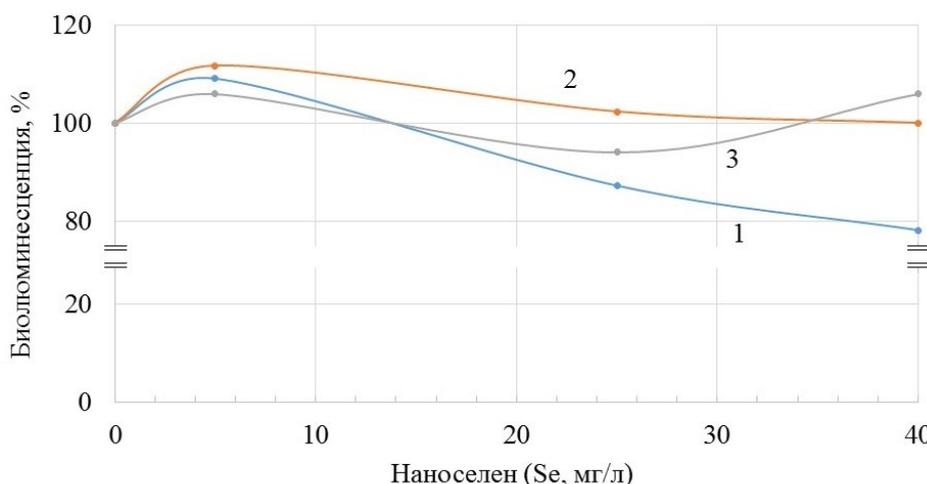


Рис. 5. Действие наноселена на биоломинесценцию тест-бактерий *A. fischeri* F1 при времени инкубации: 1 – 15 мин; 2 – 30 мин; 3 – 60 мин

Полученный нанобиокомпозит селена совмещает три биологически активных компонента: высокостабильные наночастицы селена и природные полисахариды: альгинат натрия и хитозан. Образующиеся селеносодержащие наноструктуры успешно могут быть использованы в сельском хозяйстве для предпосевной обработки культурных растений, о чем свидетельствуют результаты проведенных исследований. На рисунке 6 представлены данные обработки семян гороха сорта «Мадонна» и ячменя сорта «Кузен» раствором нанобиокомпозита селена в концентрациях – по селену 10–30 мг/л.

Высокие значения этих показателей у обоих сортов отмечены при концентрации наноселена 20 мг/л. Под влиянием наноселена энергия прорастания семян у гороха увеличилась на 9–11%, а всхожесть – на 5–7%, тогда как эти показатели у ячменя на 4–7% соответственно, по сравнению с контролем. Результаты исследований по влиянию наноселена на накопление биомассы (рис. 7) показали, что большая активность ростовых процессов у гороха и ячменя отмечена в опытном варианте также при концентрации наноселена 20 мг/л.

У гороха в этом варианте наблюдалось увеличение массы сухого вещества корней на 16.7%, а надземной части – на 4.6% по сравнению с контролем, тогда как у ячменя эти показатели составили для корней 14.1%, а для надземной части – 16.6%.

Достоинством полученного нанобиокомпозита селена является доступность сырья, безопасная технология его производства, нетоксичность и достаточно высокая биологическая активность. Он может быть использован для создания новых эффективных медицинских, фармакологических, ветеринарных и сельскохозяйственных препаратов.

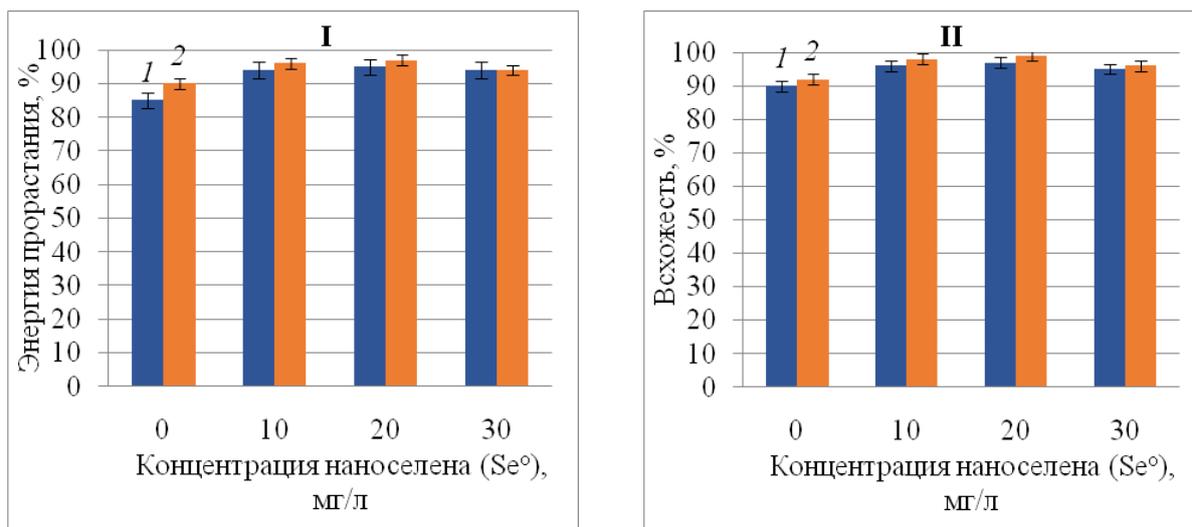


Рис. 6. Влияние наноселена на энергию прорастания (I) и всхожесть семян (II) культурных растений: 1 – горох сорта «Мадонна», 2 – ячмень сорта «Кузен»

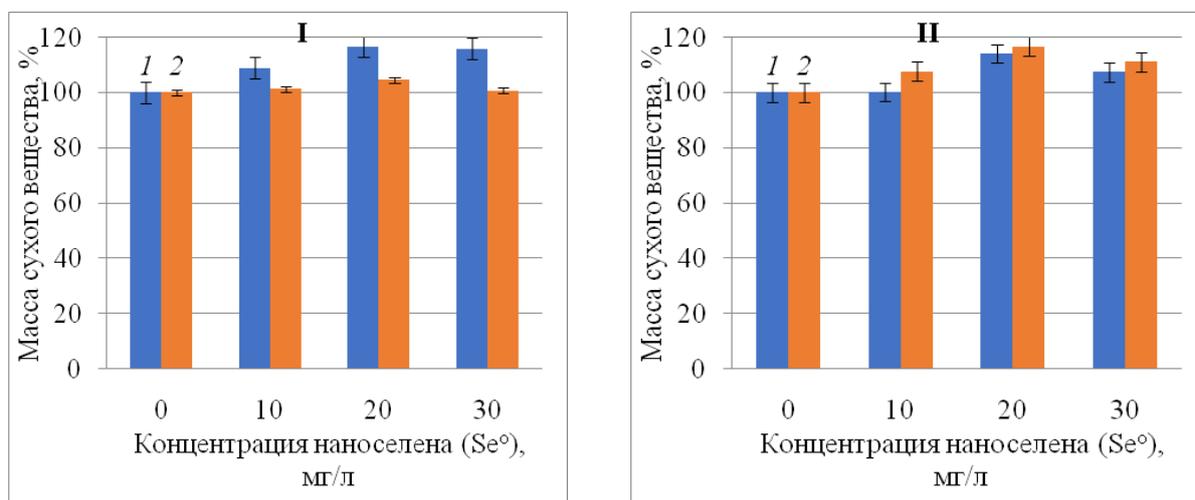


Рис. 7. Влияние наноселена на накопление биомассы 7-дневных проростков гороха сорта «Мадонна» (I) и ячменя сорта «Кузен» (II): 1 – корни, 2 – надземная часть

Выводы

1. Установлено, что в результате восстановления ионного селена в редокс-системе селенит–цистеин в водном растворе низкоконцентрированного альгинат-хитозанового полиэлектролитного комплекса образуются достаточно устойчивые наночастицы селена (в течение трех месяцев), со средним размером частиц 40 нм.

2. Показано наличие острой и хронической биотоксичности селенита натрия в отношении тест-бактерий *A. fischeri* F1. Получение стабилизированных наночастиц селена приводит к потере биотоксических свойств и отсутствию влияния на характеристики биолюминесценции и роста тест-бактерий.

3. Селеносодержащая наноструктура оказывает существенное влияние на энергию прорастания и всхожесть семян гороха сорта «Мадонна» и ячменя сорта «Кузен», а также наблюдалось увеличение массы сухого вещества корней и надземной части. Максимальный эффект влияния наноселена отмечен при концентрации 20 мг/л.

Список литературы

1. Решетник Л.А., Парфенова Е.О. Селен и здоровье человека (обзор литературы) // Экология моря. 2000. Т. 54. С. 20–25.
2. Третьяк Л.Н., Герасимов Е.М. Специфика влияния селена на организм человека и животных (применительно к проблеме создания селеносодержащих продуктов питания) // Вестник Оренбургского государственного университета. 2007. Т. 79. №12. С. 136–145.
3. Guillin O.M., Vindry C., Ohlmann T., Chavatte L. Selenium, Selenoproteins and Viral Infection // *Nutrients*. 2019. Vol. 11(9). P. 2101. DOI: 10.3390/nu11092101.
4. Громова О.А., Гоголева И.В. Селен впечатляющие итоги и перспективы применения // Трудный пациент. 2007. Т. 5. №14. С. 25–30.
5. Голубкина Н.А., Полуобояринов П.А., Синдирева А.В. Селен в продуктах растительного происхождения // Вопросы питания. 2017. Т. 86. №2. С. 63–69.
6. Скоринова К.Д., Кузьменко В.В., Василенко А.И. Перспектива создания лекарственных препаратов на основе наночастиц селена (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020. Т. 9. №2. С. 33–44. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-33-44.
7. Zhang J.S., Gao X.Y., Zhang L.D., Bao Y.P. Biological effects of a nano red elemental selenium // *BioFactors*. 2001. Vol. 15. N1. Pp. 27–38. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.10.025.
8. Tran P.A., Webster T.J. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth // *International Journal of Nanomedicine*. 2011. Vol. 6. Pp. 1553–1558. DOI: 10.2147/IJN.S21729.
9. Nikonov I.N., Folmanis J.G., Kovalenko L.V., Laptev G.Y., Folmanis G.E., Egorov I.A., Fisinin V.I., Tananaev I.G. Biological activity of nanoscale colloidal selenium // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2012. Vol. 447. Pp. 297–299. DOI: 10.1134/S1607672912060075.
10. Карпова Е.А., Демиденко О.К., Ильина О.П. К вопросу о токсичности препаратов на основе наноселена // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2014. №4 (91). С. 207–210.
11. Валуева С.В., Вылегжанина М.Э., Лаврентьев В.К., Боровикова Л.Н., Суханова Т.Е. Биогенные наноразмерные системы на основе наночастиц селена: самоорганизация, структура и морфология // Журнал физической химии. 2013. Т. 87. №3. С. 499–504.
12. Валуева С.В., Боровикова Л.Н. Влияние природы биологически активного стабилизатора на спектральные и размерные характеристики гибридных селеносодержащих наносистем // Журнал физической химии. 2019. Т. 93. №1. С. 113–118.
13. Панов Д.А. Получение и свойства нанобиокомпозита селена и альгината натрия // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология, химия. 2017. Т. 3 (69). №1. С. 91–98.
14. Юркова И.Н., Панов Д.А. Наноконпозиция серебра в матрице альгината натрия. Тенденции и инновации фундаментальных и прикладных наук. Ставрополь, 2016. 202 с.
15. Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Val'chuk N.A., Bogolitsyn K.G., Boitsova T.A., Chukhchin D.G. Gels of sodium alginate-chitosan interpolyelectrolyte complexes // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017. Vol. 91. N8. Pp. 1580–1585. DOI: 10.1134/S0036024417080064.
16. Юсова А.А., Гусев И.В., Липатова И.М. Свойства гидрогелей на основе смесей альгината натрия с другими полисахаридами природного происхождения // Химия растительного сырья. 2014. №4. С. 59–66. DOI: 10.14258/jcrpm.201404380.
17. Панов Д.А. Влияние хитозана на физико-химические свойства альгината натрия // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология, химия. 2018. Т. 4 (70). №4. С. 311–319.
18. Киржанова Е.А., Печенкин М.А., Демина Н.Б., Балабушевич Н.Г. Микро- и наночастицы из альгината и хитозана для трансмукозальной доставки белка // Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия. 2016. Т. 57. №2. С. 103–111.
19. Rivera M.C., Pinheiro A.C., Bourbon A.I., Cerqueira M.A., Vicente A.A. Hollow chitosan/alginate nanocapsules for bioactive compound delivery // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. Vol. 79. Pp. 95–102. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.03.003.
20. Каблов В.Ф., Иощенко Ю.П. Проблема сбора нефти и нефтепродуктов при аварийных разливах // Фундаментальные исследования. 2004. №6. С. 64–65.
21. Максимова С.Н., Пономаренко С.Ю., Суровцева С.Ю., Федосеева Е.В., Полещук Д.В. Перспективы охлаждения гидробионтов льдом с использованием хитозана и его полиэлектrolитных комплексов // Известия ТИНРО. 2016. Т. 186. С. 231–237.
22. Панов Д.А., Юркова И.Н., Омельченко А.В. Синтез нового нанобиокомпозита селена и его влияние на рост пшеницы в условиях водного и солевого стрессов // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология, химия. 2019. Т. 5 (71). №3. С. 226–235.
23. Усов А.И. Альгиновые кислоты и альгинаты: методы анализа, определения состава и установления строения // Успехи химии. 1999. Т. 68. №11. С. 1051–1061.
24. Суздаев И.П. Нанотехнология: Физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. М., 2019. 592 с.
25. Costenaro D., Bisio C., Carniato F., Safronyuk S.L., Kramar T.V., Taran M.V., Starodub M.F., Katsev A.M., Guidotti M. Physico-chemical properties, biological and environmental impact of Nb-saponites catalysts for the oxidative

- degradation of chemical warfare agents // *ChemistrySelect*. 2017. Vol. 2. N5. Pp. 1812–1819. DOI: 10.1002/slct.201700042.
26. Antypenko O.M., Antypenko L.M., Kovalenko S.I., Katsev A.M., Achkasova O.M. Potential of N-aryl(benzyl,heteryl)-2-(tetrazolo[1,5-c]quinazolin-5-ylthio)acetamides as anticancer and antimicrobial agents // *Arabian Journal of Chemistry*. 2016. Vol. 9. N6. Pp. 792–805. DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.09.009.
27. Starodub N.F., Shavanova K.E., Taran M.V., Katsev A.M., Safronyuk S.L., Sonko R.V., Bisio C., Guidotti M. Nanomaterials: Biological effects and some aspects of applications in ecology and agriculture // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. 2014. 942106. DOI: 10.1117/12.2081468.
28. Suppi S., Kasemets K., Ivask A., Künnis-Beres K., Sihtmäe M., Kurvet I., Aruoja V., Kahru A. A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae // *Journal of Hazardous Materials*. 2015. Vol. 286. N9. Pp. 75–84. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.027.
29. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. М., 2009. 248 с.
30. Hashmi M.Z., Naveedullah, Shen H., Zhu S., Yu C., Shen C. Growth, bioluminescence and shoal behavior hormetic responses to inorganic and/or organic chemicals: a review // *Environment International*. 2014. Vol. 64. Pp. 28–39. DOI: 10.1016/j.envint.2013.11.018.

Поступила в редакцию 3 марта 2021 г.

После переработки 28 октября 2021 г.

Принята к публикации 11 ноября 2021 г.

Для цитирования: Панов Д.А., Кацев А.М., Омельченко А.В. Синтез и свойства наночастиц селена в матрице природных полисахаридов // *Химия растительного сырья*. 2022. №1. С. 81–91. DOI: 10.14258/jcrpm.2022019275.

*Panov D.A.**, *Katsev A.M.*, *Omel'chenko A.V.* SYNTHESIS AND PROPERTIES OF SELENIUM NANOPARTICLES IN NATURAL POLYSACCHARIDES MATRIX

Crimean Federal University. V.I. Vernadsky, pr. Akademika Vernadskogo, 4, Simferopol, 295007, (Russia), e-mail: panovda@cfuv.ru

Selenium nanoparticles were obtained by reduction of sodium selenite in aqueous solutions of nonstoichiometric alginate-chitosan polyelectrolyte complexes. Amorphous red nanosized selenium, formed as a result of the reaction, were characterized by maximum absorption at 256 nm. The process of formation and morphological characteristics of them were studied at different mass ratio of the components in the selenium-polysaccharide complex (in the range from 0.01 to 0.10). The morphological, dimensional, and spectral characteristics of obtained selenium nanoparticles were determined by transmission electron microscopy (TEM) and UV spectroscopy. The sample of nanoselenium was shown to consist of single nanoparticles, mostly spherical or partially elongated shapes, with an average size of 40 nm. The replacement of alginate (no more than 10%) with chitosan causes a significant increase in the stability of selenium nanoparticles, preventing them against aggregation and color change for three months.

The biotoxicity of the synthesized nanoselenium was studied using *Aliivibrio fischeri* F1 bioluminescent assay. Selenium nanosamples were found to have no any inhibitory effect on bacterial bioluminescence and growth and thus have neither acute nor chronic biotoxicity. On contrary, sodium selenite, used for a comparison, decreased the bioluminescence of *A. fischeri* F1 at concentrations more than 100 mg/L. The values of Na_2SeO_3 half maximal effective concentration (EC_{50}) were measured to be 420–820 mg/L at 15–60 minutes of incubation. Chronic biotoxicity of sodium selenite was manifested at concentrations more than 30 mg/L, and at 300 mg/L and higher led to a complete suppression of *A. fischeri* F1 growth and bioluminescence.

Experimental study of biological properties of obtained selenium nanoparticles revealed an increase in seed germination and vigor of pea (*Pisum sativum* L.) of Madonna variety and barley (*Hordeum vulgare* L.) of Kuzen variety, as well as an increase in the dry matter mass of their roots and aerial parts. A high activity of growth processes for the studied crops was noted at a nanoselenium concentration of 20 mg/l.

Keywords: alginate, chitosan, nanoselenium, polyelectrolyte complex, pea and barley seeds, bioluminescent assay, toxicity.

* Corresponding author.

Referenses

1. Reshetnik L.A., Parfenova Ye.O. *Ekologiya morya*, 2000, vol. 54, pp. 20–25. (in Russ.).
2. Tret'yak L.N., Gerasimov Ye.M. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2007, vol. 79, no. 12, pp. 136–145. (in Russ.).
3. Guillin O.M., Vindry C., Ohlmann T., Chavatte L. *Nutrients*, 2019, vol. 11(9), p. 2101. DOI: 10.3390/nu11092101.
4. Gromova O.A., Gogoleva I.V. *Trudnyy patsiyent*, 2007, vol. 5, no. 14, pp. 25–30. (in Russ.).
5. Golubkina N.A., Poluboyarinov P.A., Sindireva A.V. *Voprosy pitaniya*, 2017, vol. 86, no. 2, pp. 63–69. (in Russ.).
6. Skorinova K.D., Kuz'menko V.V., Vasilenko A.I. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*, 2020, vol. 9, no. 2, pp. 33–44. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-33-44. (in Russ.).
7. Zhang J.S., Gao X.Y., Zhang L.D., Bao Y.P. *BioFactors*, 2001, vol. 15, no. 1, pp. 27–38. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.10.025.
8. Tran P.A., Webster T.J. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, vol. 6, pp. 1553–1558. DOI: 10.2147/IJN.S21729.
9. Nikonov I.N., Folmanis J.G., Kovalenko L.V., Laptev G.Y., Folmanis G.E., Egorov I.A., Fisinin V.I., Tananaev I.G. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2012, vol. 447, pp. 297–299. DOI: 10.1134/S1607672912060075.
10. Karpova Ye.A., Demidenko O.K., Il'ina O.P. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2014, no. 4 (91), pp. 207–210. (in Russ.).
11. Valuyeva S.V., Vylegzhanina M.E., Lavrent'yev V.K., Borovikova L.N., Sukhanova T.Ye. *Zhurnal fizicheskoy khimii*, 2013, vol. 87, no. 3, pp. 499–504. (in Russ.).
12. Valuyeva S.V., Borovikova L.N. *Zhurnal fizicheskoy khimii*, 2019, vol. 93, no. 1, pp. 113–118. (in Russ.).
13. Panov D.A. *Uchenyye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya, khimiya*, 2017, vol. 3 (69), no. 1, pp. 91–98. (in Russ.).
14. Yurkova I.N., Panov D.A. *Nanokompozitsiya serebra v matritse al'ginata natriya. Tendentsii i innovatsii fundamental'nykh i prikladnykh nauk*. [Silver nanocomposition in sodium alginate matrix. Trends and innovations in fundamental and applied sciences]. Stavropol', 2016, 202 p. (in Russ.).
15. Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Val'chuk N.A., Bogolitsyn K.G., Boitsova T.A., Chukhchin D.G. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2017, vol. 91, no. 8, pp. 1580–1585. DOI: 10.1134/S0036024417080064.
16. Yusova A.A., Gusev I.V., Lipatova I.M. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2014, no. 4, pp. 59–66. DOI: 10.14258/jcprm.201404380. (in Russ.).
17. Panov D.A. *Uchenyye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya, khimiya*, 2018, vol. 4 (70), no. 4, pp. 311–319. (in Russ.).
18. Kirzhanova Ye.A., Pechenkin M.A., Demina N.B., Balabushevich N.G. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 2: Khimiya*, 2016, vol. 57, no. 2, pp. 103–111. (in Russ.).
19. Rivera M.C., Pinheiro A.C., Bourbon A.I., Cerqueira M.A., Vicente A.A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, vol. 79, pp. 95–102. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.03.003.
20. Kablov V.F., Ioshchenko Yu.P. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2004, no. 6, pp. 64–65. (in Russ.).
21. Maksimova S.N., Ponomarenko S.Yu., Surovtseva S.Yu., Fedoseyeva Ye.V., Poleshchuk D.V. *Izvestiya TINRO*, 2016, vol. 186, pp. 231–237. (in Russ.).
22. Panov D.A., Yurkova I.N., Omel'chenko A.V. *Uchenyye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya, khimiya*, 2019, vol. 5 (71), no. 3, pp. 226–235. (in Russ.).
23. Usov A.I. *Uspekhi khimii*, 1999, vol. 68, no. 11, pp. 1051–1061. (in Russ.).
24. Suzdalev I.P. *Nanotekhnologiya: Fiziko-khimiya nanoklastero, nanostruktur i nanomaterialov*. [Nanotechnology: Physical Chemistry of Nanoclusters, Nanostructures and Nanomaterials]. Moscow, 2019, 592 p. (in Russ.).
25. Costenaro D., Bisio C., Carniato F., Safronyuk S.L., Kramar T.V., Taran M.V., Starodub M.F., Katsev A.M., Guidotti M. *ChemistrySelect*, 2017, vol. 2, no. 5, pp. 1812–1819. DOI: 10.1002/slct.201700042.
26. Antypenko O.M., Antypenko L.M., Kovalenko S.I., Katsev A.M., Achkasova O.M. *Arabian Journal of Chemistry*, 2016, vol. 9, no. 6, pp. 792–805. DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.09.009.
27. Starodub N.F., Shavanova K.E., Taran M.V., Katsev A.M., Safronyuk S.L., Sonko R.V., Bisio C., Guidotti M. *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*, 2014, 942106. DOI: 10.1117/12.2081468.
28. Suppi S., Kasemets K., Ivask A., Künnis-Beres K., Sihtmäe M., Kurvet I., Aruoja V., Kahru A. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, vol. 286, no. 9, pp. 75–84. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.027.
29. Deryabin D.G. *Bakterial'naya bioluminescenciya: fundamental'nyye i prikladnyye aspekty*. [Bacterial Bioluminescence: Fundamental and Applied Aspects]. Moscow, 2009, 248 p. (in Russ.).
30. Hashmi M.Z., Naveedullah, Shen H., Zhu S., Yu C., Shen C. *Environment International*, 2014, vol. 64, pp. 28–39. DOI: 10.1016/j.envint.2013.11.018.

Received March 3, 2021

Revised October 28, 2021

Accepted November 11, 2021

For citing: Panov D.A., Katsev A.M., Omel'chenko A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 1, pp. 81–91. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2022019275.

