

# НАНОЧАСТИЦЫ ХИТОЗАН–ТРИПОЛИФОСФАТ: СИНТЕЗ МЕТОДОМ ИОННОГО ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЯ, СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2020 г. Э. В. Попова<sup>a,\*</sup>, И. М. Зорин<sup>b</sup>, Н. С. Домнина<sup>b</sup>,  
И. И. Новикова<sup>a</sup>, И. Л. Краснобаева<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,  
Подбельского шоссе 3, Пушкин, 196608 Россия

<sup>b</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия  
\*e-mail: elzavporova@mail.ru

Поступило в Редакцию 3 февраля 2020 г.  
После доработки 3 февраля 2020 г.  
Принято к печати 6 февраля 2020 г.

Методом ионного гелеобразования хитозана ( $M 6.5 \times 10^3$  и  $60 \times 10^3$  Да) в присутствии триполифосфата получены наночастицы со средним размером около 100 нм. Дисперсии наночастиц проявили высокую антимикробную активность против патогенных организмов – бактерии *S. michiganensis* (штамм 101) и грибов *F. graminearum* и *A. solani*.

**Ключевые слова:** хитозан, ионное гелеобразование, наночастицы, антимикробная активность

**DOI:** 10.31857/S0044460X20070173

Хитозан с его уникальными свойствами – нетоксичностью, биосовместимостью, способностью к биодegradации, поликатионной структурой – широко используется в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве [1–9]. Широкий спектр биологической активности хитозана обуславливает его применение в растениеводстве в качестве средств, стимулирующих рост и развитие растений, а также в препаратах, защищающих многие сельскохозяйственные культуры от грибковых, вирусных и бактериальных заболеваний [2, 5].

Основной критерий применимости хитозана для этих целей – величина его молекулярной массы, во многом определяющая его биологические свойства. Однако до сих пор не выявлено однозначной корреляции между величиной  $M$  хитозана и его биологическими свойствами [10–13]. Изменение молекулярной массы полимера влечет за собой изменение механизма и локуса его биологического действия, а конечный эффект определяется свойствами изучаемой системы в целом. Поэтому поиск максимальной биологической активности хитозана проводится в широком диапазоне моле-

кулярных масс. Существенным ограничением использования хитозана в растениеводстве является его нерастворимость в воде при  $pH \geq 6$  [2, 5].

Использование хитозана в сельском хозяйстве в форме наночастиц наиболее перспективно [13–17], может повысить его эффективность независимо от величины  $M$  и создать преимущества в борьбе с различными болезнями [15]. Среди разнообразных методов получения наночастиц хитозана наиболее известен метод ионного гелеобразования [18–21]. Он заключается в формировании ионного комплекса в результате электростатического взаимодействия положительно заряженных аминогрупп хитозана, протонированных в растворах при  $pH = 4.0–6.5$ , с трехвалентным анионом триполифосфата. К преимуществам этого метода относятся возможность контролировать свойства наночастиц, отсутствие побочных химических реакций и нетоксичность триполифосфата.

Нами изучены физико-химические свойства нано- и микрочастиц, полученных из образцов хитозана с различной молекулярной массой, и иссле-

**Таблица 1.** Условия окислительной деструкции хитозана ( $M 150 \cdot 10^3$  Да) и характеристика полученных образцов по молекулярной массе ( $M$ ) и по размерам ( $R$ ) в ацетатном буфере при  $pH = 5$ 

№ образца	( $\text{NaNO}_2$ ), г/на 5 г хитозана	Время реакции, мин	Выход реакции, %	$M$ образца, $\times 10^{-3}$	$R$ , нм	$R$ , нм <sup>a</sup>
1	0.043	150	47	6.5	6, 46	6, 46
2	0.024	120	80	60	8, 50, 277	7, 153
Исходный образец	–	–	–	150	9, 41, 503	9, 416

<sup>a</sup> После ультразвукового воздействия в течение 30 мин.

**Таблица 2.** Влияние концентрации хитозана в реакции с триполифосфатом, скорости (3200, 6200, 15000 об/мин) и времени (1, 2 ч) центрифугирования дисперсий, полученных в буфере при  $pH = 5$ , на размеры частиц

№	Хитозан, $M \times 10^{-3}$	$c$ , мг/мл	$R_{\text{исх}}$ , нм	3200		6200		15000	
				1	2	1	2	1	2
1	6.5	0.5	115						
2, 3, 4		2, 2 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup>	130, 118, 90	104	102	–	–	45	22
5		6	240						
6	60	2	61, 210	38, 166	30, 128	93	16, 84	59	55
7	150	2	59, 323	135	28, 160	–	–	23, 93	83

<sup>a</sup> После воздействия ультразвуком в течение 30 мин.

<sup>b</sup> После хранения 5 сут при 4°C и воздействия ультразвуком в течение 30 мин.

дована их антимикробная и фунгицидная активность в сравнении с исходным полимером.

Для получения образцов хитозана с различной молекулярной массой была выбрана окислительная деструкция хитозана [22], протекающая в достаточно мягких условиях при действии нитрита натрия. Варьируя количество  $\text{NaNO}_2$  и время реакции, мы получили 2 образца хитозана с  $M 6.5 \times 10^3$  и  $60 \times 10^3$  Да (табл. 1). Получение образцов из одного исходного хитозана ( $M 150 \times 10^3$  Да) позволило в дальнейшем провести сравнительное изучение их свойств. Выбор исходного хитозана с высоким содержанием звеньев с аминогруппами (степень деацетилирования 85%) обусловлен потенциальными биоцидными свойствами такого хитозана [5].

В водных растворах макромолекулы полисахаридов, в том числе и хитозана, способны к агрегации [2, 18]. Такие растворы представляют собой смесь частиц различных размеров, что отражается в полимодальном распределении по размерам. Исходный хитозан и полученные из него образцы были охарактеризованы по размерам методом динамического рассеяния света. Образцы неоднородны (табл. 1), в распределении присутствует мода собственно макромолекул хитозана с гидродинамическим радиусом до 10 нм и моды агрегатов макромолекул хитозана с гидродинамическим

радиусом от 50 нм и более. Агрегаты представляют собой достаточно рыхлые образования, размеры которых могут изменяться при ультразвуковом воздействии, а также при хранении [23]. Слабое ультразвуковое воздействие разрушает агрегаты, преобразуя их в стабильную моду с усредненным размером, однако в образце хитозана с  $M 6.5 \times 10^3$  Да при действии ультразвука распределение агрегатов по размерам не изменяется. Исходный хитозан и полученные при его деструкции образцы были использованы для получения наночастиц.

На основании литературных данных [18, 19, 23] и предварительных экспериментов были определены оптимальные условия получения наночастиц методом ионного гелеобразования, изучено влияние способа выделения, хранения и воздействия ультразвука на размеры частиц в образующихся дисперсиях (табл. 2). Выбор условий синтеза и обработки ультразвуком дисперсии наночастиц представлено на примере образца с  $M 6.5 \times 10^3$  Да. Синтез проводили в ацетатном буфере при различных концентрациях хитозана и при постоянной концентрации триполифосфата (0.84 мг/мл), соотношение хитозан (аминогруппы)–триполифосфат не менее 5:1 (моль). После формирования наночастиц реакционную смесь подвергали диализу против воды.

**Таблица 3.** Параметры дисперсий, полученных из свежевыделенных наночастиц хитозана ( $M 60 \times 10^3$  Да)

№	Среда для триполифосфата	Среда для хитозана	Параметры			Концентрация наночастиц в дисперсии, мг/мл
			R, нм	PDI	ζ-потенциал, мВ	
1	Буфер, pH = 5	Буфер, pH = 5	47	0.45	26.8±3	1.85
2	Буфер, pH = 4.5	Буфер, pH = 4.5	211	0.25	19.8±2	0.89
3	Вода	Вода, pH = 5	185	0.32	11.2±1	0.91
4 <sup>a</sup>	Вода	Вода, pH = 5	300, 1200	–	–	0.91
5 <sup>b</sup>	Буфер, pH = 5	Буфер, pH = 5	210	0.51	21.4±0.5	1.04

<sup>a</sup> Через 5 дней хранения при 4°C.

<sup>b</sup>  $M 6.5 \times 10^3$ .

Из хитозана с  $M 6.5 \times 10^3$  Да ( $c = 2$  мг/мл) получены наночастицы с размером 130 нм, а при увеличении концентрации хитозана в 3 раза образовались более крупные частицы (табл. 2). К уменьшению размеров частиц приводит обработка полученной дисперсии ультразвуком. При хранения дисперсии в холодильнике (4°C, 5 сут) выпадал осадок, но при действии ультразвука происходило его диспергирование и формирование дисперсии со средним размером частиц ~90 нм.

Для извлечения наночастиц полученные дисперсии центрифугировали, варьируя скорость и продолжительность. Центрифугирование позволяет последовательно удалять из дисперсии частицы крупной фракции, и средний размер частиц, оставшихся в супернатанте, снижается. На примере образца с  $M 60 \times 10^3$  Да видно как изменяются во времени размеры частиц в супернатанте по ходу центрифугирования.

Полученные при центрифугировании (15000 об/мин, 2 ч) осадки с выходом до 10% лиофильно сушили и затем суспендировали в деионизированной воде. Воду добавляли с таким расчетом, чтобы концентрация комплекса хитозан–триполифосфат в дисперсии была ~1.5 мг/мл. Однако только для образца с  $M 6.5 \times 10^3$  Да удалось получить стабильную дисперсию наночастиц, причем для этого потребовалось добавление 5%-ного неионногенного стабилизатора Твин-80. Распределение по размерам частиц для этого образца характеризовалось двумя модами:  $43 \pm 4$  и  $147 \pm 13$  нм.

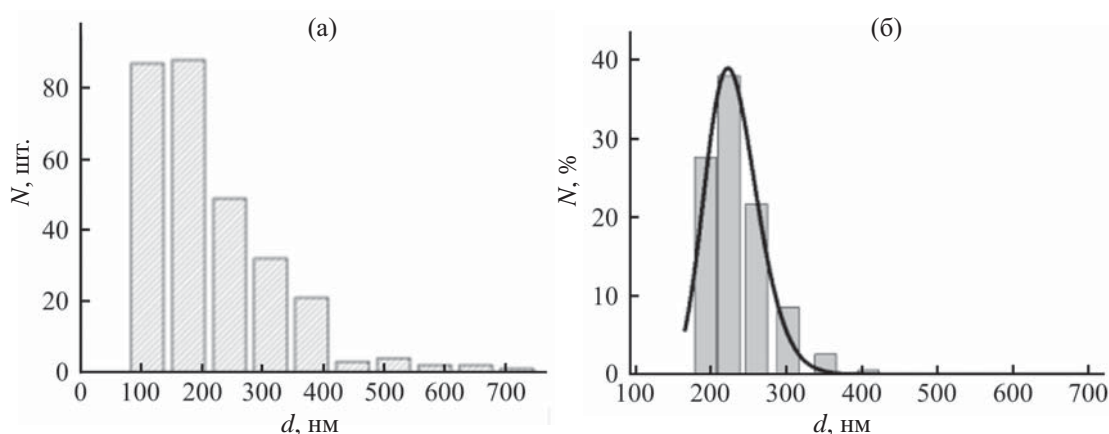
Лиофилизация дисперсий – общепринятая технология, обеспечивающая долгосрочное хранение полимерных наночастиц [18, 24]. Если лиофилизация не позволяет достичь полного повторного диспергирования осадка, что обычно обусловлено агрегацией или необратимым слиянием наночастиц,

водную дисперсию можно хранить в холодильнике (4°C) несколько дней [25]. После тщательного промывания осадков деионизированной водой и повторного их суспендирования с добавкой Твин-80 образовавшиеся дисперсии подвергали воздействию ультразвука в течение 30 мин и затем фильтровали для удаления визуально видимых агрегированных частиц.

Для изучения влияния изменения среды при синтезе на размеры свежевыделенных вышеуказанным способом частиц, повторно суспендированных в воде с добавлением Твин-80, образцы хитозана растворяли в ацетатном буфере (pH = 4.5, 5.0) или в воде (pH = 5) (табл. 3).

Снижение pH буфера до 4.5 при получении дисперсий приводит к увеличению размеров наночастиц, а их концентрация уменьшается в 2 раза. При синтезе в водной среде при pH = 5 размеры наночастиц также увеличиваются, как и при pH = 4.5 происходит снижение ζ-потенциала и выхода наночастиц. Если в свежеприготовленной дисперсии (табл. 3, оп. № 3) присутствуют частицы одного размера, то после хранения в течение 5 сут (табл. 3, оп. № 4) в образце появляется осадок, при перемешивании которого в распределении по размерам обнаружены агрегаты микронного размера.

Взаимодействие между хитозаном и триполифосфатом было подтверждено сравнением ИК спектров исходного хитозана и полученных наночастиц. Полоса в области  $3500\text{--}3300$  см<sup>-1</sup>, обусловленная валентными колебаниями связей функциональных групп N–H и O–H хитозана, становится шире, что свидетельствует об усилении водородной связи при образовании наночастиц. При образовании ионного комплекса хитозан–триполифосфата максимумы поглощения валентных и деформационных колебаний связей N–H



**Рис. 1.** Распределение частиц по диаметрам по данным атомно-силовой микроскопии (а) и распределение наночастиц в дисперсии по гидродинамическим диаметрам (б) из данных динамического рассеяния света для образца хитозана с  $M 60 \times 10^3$  Да (образец № 6, табл. 2).

смещаются в сторону низких частот. Полоса при  $1599 \text{ см}^{-1}$ , наблюдающаяся в спектре исходного хитозана, сдвигается к  $1561 \text{ см}^{-1}$ . Вместо полосы при  $1650 \text{ см}^{-1}$  в спектре наночастиц появляется полоса при  $1630 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая деформационным колебаниям связи N–H в ионе  $\text{NH}_3^+$ . Указанные изменения в ИК спектрах наночастиц обусловлены взаимодействием аминогруппы и фосфат-аниона и образованием комплекса хитозан–триполифосфат [26, 27].

Некоторые образцы, представляющие собой дисперсии наногелей шитого хитозана, охарактеризованы распределением частиц по размерам методом динамического рассеяния света в дисперсии и визуализированы с помощью атомно-силовой микроскопии после адсорбции на слюду. Метод атомно-силовой микроскопии позволяет получить информацию о размерах частиц после их адсорбции на слюду и высушивания. Эти процессы приводят к деформации частиц, на поверхности слюды они имеют форму сегмента шара. Можно приближенно вычислить диаметр исходной частицы в растворе, предполагая, что объем вещества частицы в дисперсии и на поверхности слюды после адсорбции сохраняется. Для этого по формуле для вычисления объема сегмента шара (1) из данных атомно-силовой микроскопии получаем радиус основания  $r$  и высоту  $h$ , а затем вычисляем радиус  $R$  сферической частицы в дисперсии по соотношению (2).

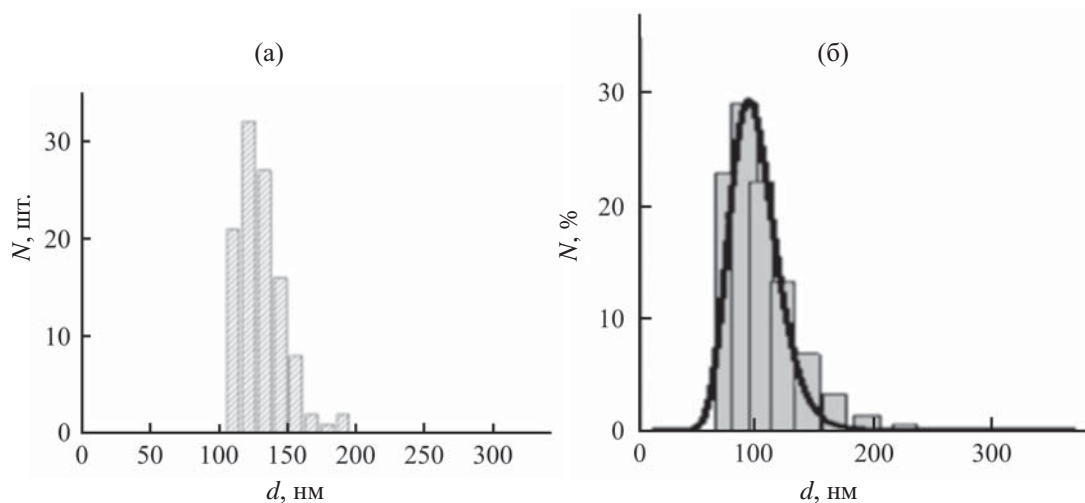
$$V = \pi h(3r^2 + h^2)/6, \quad (1)$$

$$V = 4\pi R^3/3. \quad (2)$$

Можно трактовать данные атомно-силовой микроскопии иначе: в предположении быстрой и сильной адсорбции на слюду контакт частицы со слюдой приводит к формированию на поверхности пятна из материала частицы, форма и размер которого соответствуют проекции частицы на поверхность (т. е. диаметр объекта атомно-силовой микроскопии может соответствовать диаметру частицы в дисперсии). Частица при этом разрушается и ее объем более не соответствует объему исходной частицы.

Методами атомно-силовой микроскопии и динамического рассеяния света получены результаты, не противоречащие друг другу. Образец хитозана с  $M 60 \times 10^3$  Да (табл. 2, оп. № 6), очищенный диализом и подвергнутый обработке ультразвуком в течение 30 мин, состоял из частиц разных размеров, образовавшихся при взаимодействии хитозана и триполифосфата, а также из частиц хитозана в виде агрегатов. На изображении атомно-силовой микроскопии визуализировано множество адсорбированных частиц неопределенной формы с широким распределением по размерам: присутствуют большие частицы (агрегаты), средний диаметр которых  $281 \pm 55$  нм, а средняя высота  $13 \pm 3$  нм, при этом видны и более мелкие частицы (рис. 1).

Эти параметры адсорбированных частиц могут соответствовать диаметру  $\sim 90$  нм частиц в дис-



**Рис. 2.** Распределение частиц по диаметрам по данным атомно-силовой микроскопии (а) и распределение наночастиц в дисперсии по гидродинамическим диаметрам (б) из данных динамического рассеяния света для образца хитозана № 1, табл. 3.

персии. Необходимо учесть, что метод атомно-силовой микроскопии дает информацию о высушенных на воздухе частицах, а метод динамического рассеяния света – о набухших частицах в воде. Поскольку гидродинамический радиус вычисляется по формуле Стокса из данных о коэффициентах поступательной диффузии, наличие гидратной «шубы» приводит к увеличению кажущегося гидродинамического радиуса. Размеры частиц (диаметр), полученные методом атомно-силовой микроскопии (диаметр в плоскости  $281 \pm 55$  нм, расчет через объем сегмента шара 90 нм) и динамического рассеяния света ( $420 \pm 28$  нм,  $120 \pm 10$  нм), можно считать приблизительно соответствующими друг другу с учетом особенностей метода измерения и расчета.

На изображении атомно-силовой микроскопии образца (табл. 3, образец 1), который сразу после получения был ресуспендирован в деионизиро-

ванной воде с добавлением Твин-80, присутствуют частицы округлой формы с узким распределением по размеру (рис. 2). Средний диаметр частиц составляет  $130 \pm 17$  нм, средняя высота –  $6 \pm 2$  нм. Диаметр частицы, рассчитанный через объем сегмента шара, равен 42 нм. Из данных динамического рассеяния света диаметр частиц составляет 94 нм. Для данного образца оба метода демонстрируют узкое мономодальное распределение по размеру частиц, а изображение атомно-силовой микроскопии подтверждает сферическую форму частиц и отсутствие их слипания. Таким образом, метод ионного гелеобразования в подобранных условиях дает возможность получать стабильные дисперсии сферических частиц хитозана диаметром около 100 нм.

Оценку бактерицидной и фунгицидной активности полученных дисперсий наночастиц в отношении фитопатогенных видов проводили в срав-

**Таблица 4.** Антагонистическая активность образцов ( $c = 140$  мкг/мл по хитозану) в отношении тест-культур фитопатогенных бактерий *Clavibacter michiganensis* (штамм 101) и гриба *Fusarium graminearum*

Образец	Диаметр зоны лизиса, мм	
	<i>C. michiganensis</i>	<i>F. graminearum</i>
	3 сут	6 сут
Контроль (вода)	0	0
Ацетатный буфер	$18.0 \pm 0.2$	$13.5 \pm 0.2$
Хитозан в ацетатном буфере, pH = 5	$22.5 \pm 0.2$	$18.0 \pm 0.1$
Дисперсия наночастиц (табл. 2, оп. № 2)	$29.5 \pm 0.1$	$20.0 \pm 0.1$



**Таблица 5.** Фунгистатическая активность раствора хитозана в ацетатном буфере (рН = 5) и дисперсии наночастиц по отношению к грибу *Alternaria solani*

Образец	с, мкг/мл	Диаметр зоны угнетения роста мицелия гриба <i>A. solani</i> в процессе культивирования, мм		Ингибирование роста гриба <i>A. solani</i> , %	
		3 сут	5 сут	3 сут	5 сут
Хитозан в ацетатном буфере	300	11.0±0.1	0	0	0
	450	13.5±0.15	0	0	0
Дисперсия наночастиц (табл. 3, оп. № 1)	300	13.0±0.1	0	10.0	23.0
	450	17.0±0.2	12.0±0.1	65.0	70.0

нении с раствором хитозана в ацетатном буфере методом бумажных фильтров (табл. 4) и методами лунок и агаровых блоков (табл. 5). Сравнение диаметров лизиса тест-культур *S. michiganensis* и гриба *F. graminearum* показало, что дисперсия наночастиц обладает большей антибактериальной и фунгицидной активностью, чем исходный хитозан (табл. 4).

Оценка прямого антагонистического действия раствора хитозана и дисперсии наночастиц на рост мицелия гриба *A. solani* методами диффузии в агар и агаровых блоков подтвердила более сильную активность дисперсии наночастиц по сравнению с раствором хитозана, а также выявила зависимость фунгистатической активности исследуемых соединений от их концентрации (табл. 5).

Если хитозан и дисперсия наночастиц в концентрации 300 мкг/мл обладают слабой фунгистатической активностью, то увеличение концентрации наночастиц до 450 мкг/мл ведет к повышению активности. В отличие от исходного хитозана, дисперсия наночастиц в концентрации 450 мкг/мл ингибирует рост мицелия гриба *A. solani* в течение 5 сут культивирования, причем уже на третьи сутки диаметр зоны угнетения роста гриба под действием дисперсии наночастиц составляет 17.0 мм, что существенно превышает зону лизиса исходного хитозана (13.5 мм). Преимущество в фунгистатической активности дисперсии наночастиц и ее зависимость от концентрации подтверждены методом агаровых блоков. Полученные данные биологических испытаний согласуются с исследованиями [28–30], в которых для нескольких видов фитопатогенных бактерий и грибов продемонстрирована более высокая антибактериальная и фунгистатическая активность дисперсий наночастиц по сравнению с хитозаном.

Таким образом, методам ионного гелеобразования из образцов хитозана различной молекулярной массы получены стабильные дисперсии наночастиц. С помощью атомно-силовой микроскопии и методом динамического рассеяния света визуализированы наночастицы с диаметром около 100 нм. Первичные испытания антагонистической активности образцов в отношении тест-культур фитопатогенных бактерий и грибов (штаммов *S. michiganensis*, *F. graminearum* и *A. solani*) показали, что, независимо от молекулярной массы хитозана, более высокую активность имеют дисперсии с наночастицами хитозана по сравнению с раствором того же полимера.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали хитозан (Биопрогресс) с  $M 150 \times 10^3$  Да и степенью деацетилирования 85%. Окислительной деструкцией при действии нитрита натрия [22] получены образцы хитозана с молекулярной массой  $6.5 \times 10^3$  и  $60 \times 10^3$  Да, определяемой вискозиметрическим методом [31]. Триполифосфат и нитрит натрия (Вектон) использовали без дополнительной очистки.

**Ионное гелеобразование** проводили с использованием образцов хитозана с разными молекулярными массами. Хитозан (30 мг) растворяли в 15 мл 0.2 М. ацетатного буфера (рН = 4.5 или 5) в течение 3 ч при постоянном перемешивании. Для проведения синтеза в водной среде хитозан в течение 3 ч при постоянном перемешивании растворяли в приготовленном растворе, рН = 5 (2%-ная уксусная кислота с добавлением раствора КОН). Полученный раствор фильтровали через фильтр Шотта (размер пор – 40 мкм). К фильтрату добавляли при постоянном перемешивании в течение 5 мин по каплям раствор триполифосфата, приготовленный

в деионизированной воде или в ацетатном буфере ( $c = 0.84$  мг/мл). Дисперсию наночастиц перемешивали 30 мин, затем облучали ультразвуком 60 мин. В дальнейшем дисперсию наночастиц подвергали в течение 4 ч диализу против деионизированной воды [19], при этом объем дисперсии нормировался и составлял 21 мл.

Дисперсию наночастиц центрифугировали 1 ч при скорости 6200 об/мин. Полученный осадок наночастиц подвергали либо лиофильной сушке, либо сразу суспендировали в деионизированной воде с добавкой Твин-80 (15 мас%) и затем 30 мин обрабатывали ультразвуком. Концентрацию наночастиц в полученной дисперсии определяли весовым методом. Для лиофильно высушенного осадка процедура суспендирования в деионизированной воде с добавкой Твин-80 (15 мас%) и обработки ультразвуком в течение 30 мин оказалась успешной только при использовании образца хитозана с  $M 6.5 \times 10^3$  Да.

Исследование образцов хитозана с разными молекулярными массами и дисперсий частиц, полученных методом гелеобразования, проведены в Ресурсном центре Санкт-Петербургского государственного университета «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники». На спектрометре Photocor Complex ( $298.00 \pm 0.05$  К, длина волны источника света  $\lambda_0 = 445$  нм) получены гидродинамические радиусы наночастиц (погрешность метода динамического рассеяния света 10%). Дзета-потенциал и диаметры частиц получены на анализаторе размеров частиц Photocor Compact-Z и на приборе Zetasizer Malvern Nano ZS ZEN 3500.

Анализ методом атомно-силовой микроскопии выполнен на микроскопе VEECO diNanoScope V в полуконтактном режиме с использованием зондов NA\_NA (NT-MDT). Для приготовления образцов использовали свежесколотую поверхность слюды. На слюду размером  $5 \times 5$  мм, наклеенную предварительно на металлическую пластину, горизонтально установленную на торцевом срезе вала электродвигателя, наносили 20 мкл исследуемой дисперсии, выдерживали 1 мин, после чего удаляли раствор со слюды, включая вращение электродвигателя 3000 об/мин на 1 мин. Образцы сушили на воздухе не менее 1 сут. Полученные изображения обрабатывали в программе NanoScope Analysis.

ИК спектры хитозана и дисперсий его наноча-

стиц снимали на Фурье-спектрометре Spectrum BX в таблетках KBr.

Для изучения антигрибной и антибактериальной активности исследуемых образцов в отношении фитопатогенных грибов и бактерий различные концентрации хитозана готовили растворением в 0.2 М ацетатном буфере, pH = 5.0. Оценку антибактериальной активности образцов по отношению к тест-культуре *S. michiganensis* (штамм 101) (возбудитель бактериального рака томата) и антигрибной активности по отношению к *F. graminearum* (возбудитель фузариоза колоса и корневой гнили зерновых культур) проводили методом бумажных дисков [32]. Оценивали диаметр (мм) зоны лизиса тест-культур на агаризованной питательной среде. Тест-культуры фитопатогенных микроорганизмов выращивали 5 сут в пробирках на скошенной питательной среде *S. michiganensis* (штамм 101) и Чапека (*F. graminearum* и *A. solani*) в термостате при 22–25°C. Для тестирования суспензии фитопатогенных культур готовили, смывая стерильной водой с поверхности скошенного агара. Поверхность агаризованной среды Чапека в чашках Петри сплошным газоном засеивали суспензиями тест-культур патогенов. Титры жизнеспособных клеток посевного материала составляли  $10^5$  КОЕ/мл для *S. michiganensis* (штамм 101) по стандарту мутности и  $10^3$  КОЕ/мл для *F. graminearum* и *A. solani* (подсчет в камере Горяева). Затем на поверхность засеянной среды помещали стерильные бумажные фильтры диаметром 10 мм, на которые пипеткой наносили растворы образцов разной концентрации, чашки с культурами помещали в термостат при 22–25°C. Через 2–3 сут для бактерий и 4–5 сут для грибов измеряли диаметр зоны отсутствия роста тест-культур вокруг фильтра.

Определение фунгистатической активности образцов по отношению к тест-культуре фитопатогенного гриба *A. solani* (возбудитель листовых пятнистостей широкого спектра сельскохозяйственных культур) проводили методом диффузии в агар (метод лунок) и методом агаровых блоков, основанных на способности угнетать рост мицелия возбудителя [33]. Поверхность питательной среды Чапека засеивали тест-культурой гриба, как было описано выше. При тестировании методом лунок в агаре стерильным пробочным сверлом вырезали

лунки диаметром 7 мм, и в них пипеткой помещали растворы наночастиц образцов хитозана с разными концентрациями. Через 4–5 сут выращивания культуры в термостате при 22–25°C измеряли диаметр зоны отсутствия роста тест-культуры гриба вокруг лунки.

При тестировании методом блоков в теплую агаризованную среду Чапека вносили растворы наночастиц определенного объема, рассчитывая конечную концентрацию в среде в зависимости от исходной концентрации наночастиц. После застывания среды на ее поверхности устанавливали агаровые блоки 5-суточной тест-культуры *A. solani*, вырезанные стерильным пробочным сверлом, и помещали чашки Петри в термостат при 22–25°C. Фунгистатическую активность оценивали по диаметру подавления роста тест-культуры через 3 и 5 сут выращивания.

Работа выполнена при технической поддержке научного парка Санкт-Петербургского государственного университета, Ресурсного образовательного центра по направлению «Химия» и Центра диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saharan V., Pal A.* Chitosan based nanomaterials in plant growth and protection. Springer: Briefs in Plant Science. 2016. 55 p.
2. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука. 2002. 368 с.
3. *Younes I., Rinaudo M.* // Marine Drugs 2015. Vol. 13. P. 1133. doi 10.3390/md13031133
4. *Hadrami E., Lorne R.* // Marine Drugs. 2010. Vol. 10. P. 968. doi 10.3390/md8040968
5. *Тютерева С.Л.* Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. СПб: ВИЗР, 2014. 212 с.
6. *El H.A., Adam L.R., Dayf F.* // Marine Drugs. 2010. Vol. 8. P. 968. doi 10.3390/md8040968
7. *Wang J., Wang L., Yu H., Zain-Ul-Abdin, Chen Y., Chen Q., Zhou W., Zhang H., Chen X.* // Int. J. Biol. Macromol. 2016. Vol. 88. P. 333. doi 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.002
8. *Tikhonov V.E., Stepnova E.A., Babak V.G., Yamskov I.A., Palma-Guerrero J., Jansson H-B, Lopez-Llorca L.V., Salinas J., Gerasimenko D.V., Avdienko I.D., Varlamov V.P.* // Carbohydr. Polym. 2006. Vol. 64. P. 66. doi 10.1016/j.carbpol.2005.10.021
9. *Fernandes J.C., Eaton P., Gomes A.M., Pintado M.E., Malcata F.X.* // Ultramicroscopy. 2009. Vol. 109. P. 854. doi 10.1016/j.ultramic.2009.03.015
10. *Kumar A.B., Varadaraj M.C., Tharanathan R.N.* // Biomacromolecules. 2007. Vol. 2. P. 566. doi 10.1021/bm060753z
11. *Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Борисова Е.А., Колесников Л.Е., Тютерева С.Л.* // Вестн. защиты растений. 2017. Т. 93. С. 28.
12. *Куликов С.Н., Оберемок Д.Р., Безродных Е.А., Тухонов В.Е., Варламов В.П.* // Уч. зап. Казанск. унив. 2013. Т. 155. Вып. 3. С. 27
13. *Kashyapa P.L., Xiang X., Heiden P.* // Int. J. Biol. Macromol. 2014. Vol. 77. P. 36. doi 10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039
14. *Jampilek J., Kralova K.* // Ecol. Chem. Eng. S. 2015. Vol. 22. P.321. doi 10.1515/eces-2015-0018
15. *Nair R., Varghese S.H., Nair B.G., Maekawa T., Yoshida Y., Kumar D.S.* // Plant Sci. 2010. Vol. 179. P. 154. doi 10.1016/j.plantsci.2010.04.012
16. *Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., Aminabhavi T.M.* // J. Control. Release. 2004. Vol. 100. P. 5. doi 10.1016/j.jconrel.2004.08.010
17. *Khot L.R., Sankaran S, Maja J.* // Crop Protection (C). 2012. Vol. 35. P. 64. doi 10.1016/i.cropro.2012.01.007
18. *Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bellich B., Cesaro A.* // Int. J. Pharm. 2013. Vol. 455. P. 219. doi 10.1016/j.ijpharm.2013.07.034
19. *Fabragas A., Minarro M., Garcia-Montoya E., Perez-Lozano P., Carrillo C., Sarrate R., Sanchez N., Tico J.R., Sune-Negre J.M.* // Int. J. Pharm.. 2013. Vol. 446. P. 199. doi 10.1016/j.ijpharm.2013.02.015
20. *Mazancová P., Némethová V., Trešlová D., Kleščíková L., Lacík I., Rázg F.* // Carbohydr. Polym. 2018. Vol. 192. P.104. doi 10.1016/j.carbpol.2018.03.030
21. *Sawtariea N., Cai Y., Lapitsky Y.* // Colloids and Surfaces: Biointerfaces. 2017. Vol. 157. P. 110. doi 10.1016/j.colsurfb.2017.05.055
22. *Власов П.С., Киселев А.А., Домнина Н.С., Попова Э.В., Тютерева С.Л.* // ЖПХ. 2009. Вып. 9. С. 1571; *Vlasov P.S., Kiselev A.A., Domnina N.S., Popova E.V., Tyutereva S.L.* // Russ. J. Appl. Chem. 2009. Vol. 82. P. 1675 doi 10.1134/S1070427209090298
23. *Vauthier C., Cabane B., Labarre D.* // Pharm. Biopharm. 2008. Vol. 69. P. 466. doi 10.1016/j.ejpb.2008.01.025



24. Agarwal M., Agarwal M.K., Shrivastav N., Pandey S., Das R., Gaur P. // Int. J. Life Sci. Sci. Res. 2018. Vol. 4. P. 1713. doi 10.21276/ijlssr.2018.4.2.17
25. Hussain Z., Sahudin S. // Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 2016. Vol. 8. P. 297.
26. Antoniou J., Liu F., Majeed H., Qi J., Yokoyama W., Zhong F. // Colloids and Surfaces (A). 2015. Vol. 465. P. 137. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.10.040
27. Hejjajia E.M.A., Smith A.M., Morris G.A. // Int. J. Biol. Macromol. 2017. Vol. 95. P. 564. doi 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.092
28. Ing L.Y., Zin N.M., A., Katas H. // Int. J. Biomaterials. 2012. Article ID 632698. doi 10.1155/2012/632698
29. Abdeltwab W.M., Abdelaliem Y.F., Metry W.A., Eldeghe-dy M. // J. Adv. Lab. Res. Biol. 2019. Vol. 10. P. 8.
30. Oh J.-W., Chun S.C., Chandrasekaran M. // Agronomy. 2019. Vol. 9. P. 1. doi 10.3390/agronomy9010021
31. Погореленко А.Б., Домнина Н.С., Попова Э.В., Тюте-рев С.Л. // Вестн. СПбГУ. Сер. 4. 2003. Т. 20. С. 97.
32. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка, 1982. 275 с.
33. Методические рекомендации по испытанию хими-ческих веществ на фунгицидную активность / Под ред. Е.И. Андреевой, В.С. Картомышева. НИИТЭХИМ. 1990. 52 с.

## Chitosan–Tripolyphosphate Nanoparticles: Synthesis by Ion Gelation Method, Properties, and Biological Activity

E. V. Popova<sup>a,\*</sup>, I. M. Zorin<sup>b</sup>, N. S. Domnina<sup>b</sup>, I. I. Novikova<sup>a</sup>, and I. L. Krasnobaeva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> All-Russian Research Institute for Plant Protection, Pushkin, 196608 Russia

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

\*e-mail: elzavpopova@mail.ru

Received February 3, 2020; revised February 3, 2020; accepted February 6, 2020

Nanoparticles with an average size of about 100 nm were obtained by ion gelation of chitosan ( $M 6.5 \times 10^3$  and  $60 \times 10^3$  Da) in the presence of tripolyphosphate. Dispersion of nanoparticles showed high antimicrobial activity against pathogenic organisms such as *C. michiganensis* bacteria (strain 101), *F. graminearum* and *A. solani* fungi.

**Keywords:** chitosan, ion gelation, nanoparticles, antimicrobial activity