ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2019, том 55, № 4, с. 386–395

УДК 632.952:577.114

ВЛИЯНИЕ ОСНОВНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА НА РОСТ ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *Botrytis cinerea*

© 2019 г. Н. В. Карпова[1, *], Б. Ц. Шагдарова[1], Т. С. Лялина[1], А. В. Ильина[1], В. М. Терешина[2], В. П. Варламов[1]

[1]*Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия*

[2]*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия*

**e-mail: ashatanr@mail.ru*

Поступила в редакцию 29.10.2018 г.
После доработки 14.01.2019 г.
Принята к публикации 20.02.2019 г.

Изучено влияние основных характеристик низкомолекулярного хитозана с молекулярной массой (**Mw**) 2–100 кДа, степенью дезацетилирования (**СД**) 60–98% и полидисперсностью (**Mw/Mn**) 1.9–2.7, полученного в результате ферментативного и химического гидролиза, на рост *Botrytis cinerea*. Наибольший ингибирующий эффект на рост гриба (индекс прорастания конидий менее 50%) оказывали хитозаны с Mw 2–13 кДа, СД 85–98% и Mw/Mn 2–2.5. Среди них наиболее эффективным оказался хитозан с Mw 13 кДа, СД 98%, ингибирующий рост мицелия гриба при концентрации 0.938 мг/мл. Этот хитозан и его комплекс с ионами меди (75 м.д.) значительно подавляли метаболическую активность гриба (до 20 и 11% соответственно), что указывало на возможность их использования при разработке фунгицидных препаратов.

Ключевые слова: низкомолекулярный хитозан, молекулярная масса, степень дезацетилирования, полидисперсность, *Botrytis cinerea*, противогрибная активность

DOI: 10.1134/S0555109919040068

Растительные патогены представляют огромную группу микроорганизмов, которые вызывают серьезные заболевания растений, снижают урожайность и качество получаемой продукции. Фитопатогенные грибы наносят значительный экономический ущерб, и ежегодные потери оцениваются более чем 200 млрд. долларов США [1].

Грибы рода *Botrytis* распространены повсеместно и входят в список наиболее опасных патогенов [2]. Грибы паразитируют на различных органах растений, ослабляя его и значительно снижая количественные и качественные показатели урожайности. Наиболее часто встречается вид *Botrytis cinerea* [3]. В настоящее время борьбу с патогеном осуществляют, применяя пестициды (фунгициды) для протравливания семян, обработки почвы и растений в период покоя и во время вегетации. Однако фунгициды оказывают многостороннее негативное влияние на окружающую среду, а также здоровье человека, часто вызывая головные боли и тошноту, а также хронические заболевания, рак и нарушение репродуктивной и эндокринной системы [4]. Альтернативным и более безопасным способом защиты растений от растительных патогенов является использование соединений природного происхождения. К их числу можно отнести полиаминосахарид – хитозан, его производные и композиты на его основе [5]. Хитозан – это дезацетилированное производное хитина, получаемое в результате его щелочной обработки. Экономически выгодными источниками хитина служат панцири ракообразных, некоторые насекомые и грибы [6].

Благодаря разнообразию природных источников получения, возможности биодеградации, совместимости с организмами и низкой токсичности [7], хитозан является привлекательным биополимером и поэтому активно изучается, находя применение в различных отраслях промышленности, в том числе в сельскохозяйственной [8]. Противогрибная активность, присущая хитозану, вызывает несомненный интерес, что связано с решением проблемы замены применения небезопасных для окружающей среды синтетических фунгицидов. В ряде работ [2, 9–14] было изучено влияние молекулярной массы (**ММ**) хитозана на противогрибные свойства. Это одна из основных характеристик, которая влияет на проявляемую полиме-

ром биологическую активность. Сообщалось [9], что гидрохлориды хитозана с ММ 360 и 6 кДа со степенью дезацетилирования (**СД**) 90% эффективно ингибировали рост мицелия и прорастание спор *Monilinia fructicola*, при этом эффект характеризовался концентрационной зависимостью. Ингибирующий эффект на рост мицелия при концентрации 0.1–0.4 г/л оказался больше для хитозана с ММ 6 кДа, а – 2 г/л действие обоих хитозанов оказалось сопоставимым. Так, минимальная ингибирующая концентрация (**МИК$_{50}$**) была 0.7 и 0.5 г/л для ММ 360 и 6 кДа соответственно. Оба хитозана сильнее ингибировали рост мицелия и в меньшей степени прорастание спор. Известно о фунгицидной активности гидрохлоридов высоко- и низкомолекулярного хитозана, характеризующихся вязкостью 100–150 (с ММ более 100 кДа) и 5 мПа (с ММ менее 50 кДа) и СД 85%, а также их олигомеров и N-ацетилглюкозамина по отношению к микроорганизмам *Candida albicans, C. krusei* и *C. glabrata*. Оказалось, что эта активность уменьшалась по мере снижения ММ и отсутствовала у N-ацетилглюкозамина [10]. Оказалось, что ММ этих хитозанов влияла только на активность по отношению к *C. albicans*. Так, МИК$_{50}$ составляла 0.00699 и 0.02616% для высоко- и низкомолекулярного хитозана соответственно. Их влияние на *C. krusei* и *C. glabrata* было сопоставимым. Так, для *C. krusei* МИК$_{50}$ было 0.01218 и 0.01313%, а *C. glabrata* – 0.01815 и 0.01840% для обоих хитозанов соответственно.

Изучалось влияние ММ хитозана на фунгицидную активность, проявляемую по отношению к шести растительным патогенам: *Alternaria alternata* (Pleosporaceae), *Fusarium graminearum* (Nectriaceae), *F. oxysporum* (Nectriaceae), *F. solani* (Nectriaceae), *Phytophthora* Сравнивали антигрибное действие хитозанов с ММ 22-387 846 кДа, при этом активность последнего оказалась существенно ниже. Эффективная концентрация, при которой наблюдалось 50%-ное ингибирование роста мицелия, находилась в интервале от 480 до 3037 мг/мл. Патогены *F. graminearum, F. oxysporum* и *R. solani* оказались менее чувствительными к действию хитозана по сравнению с *A. alternata*, *F. solani* и *P. infestans* [2]. Изучали влияние ММ водорастворимого хитозана (ММ$_w$ 1, 3, 5 и 10 кДа, СД 93%) на фунгицидную активность по отношениюк различным патогенным дрожжам и мицелиальным грибам. Было установлено, что низкомолекулярный хитозан обладал значительной активностью по отношению к *Aspergillus fumigatus* (ATCC 6145), *A. parasiticus* (ATCC 6598), *F. oxysporum* (ATCC 16909), *F. solani* (KCTC 6326), *Penicillium verrucosum var. verrucosum* (KCTC 6265) и *B. cinerea* (KACC 40573). Хитозан с ММ$_w$ 10 кДа проявлял наибольшую фунгицидную активность по отношению ко всем тестируемым микроорганизмам, МИК$_{50}$ был <0.04 мг/мл. Только для хитозана с ММ$_w$ 1 кДа МИК$_{50}$ по отношению к *B. cinerea* (KACC 40573) составляла <0.08 мг/мл, для всех остальных образцов была <0.04 мг/мл [11]. Изучалось влияние ММ хитозана (ММ 5, 37, 57 и 270 кДа) *in vitro* и *in vivo* на рост мицелия *B. cinerea* (Pers.), поражавшего спелые плоды томатов (*Solanum lycopersicum L. var. lycopersicum*) [12]. Минимальная эффективная концентрация (50%-ное ингибирование роста мицелия) хитозанов снижалась с уменьшением ММ. Так, для хитозана с ММ 5 кДа она составляла 1392 мг/л, а с ММ270 кДа – 2407 мг/л. В работе [13] изучали влияние степени полимеризации (**СП**) хитозана (СП = 206–9, что соответствует ММ ≈ 34.5–1.5 кДа), СД 85% на прорастание конидий *B. cinerea* (BC 101 и BCBD). Было показано, что при инокуляции *B. cinerea* BC 101 и BCBD наибольшим ингибирующим эффектом обладали хитозаны со СП = 23 (ММ ≈ 4.7 кДа) и 40 (ММ ≈ 6.7 кДа) в первом случае и СП 15–40 во втором.

Важной характеристикой, влияющей на проявление биологической активности хитозана, является не только ММ, но и СД [15]. Существенное влияние СД на фунгицидную активность отмечалось в ряде работ [16, 17]. Показано антигрибное действие хитозана (СД > 50%) на 46 видов тестируемых грибов с различным составом клеточной стенки [18]. Оказалось, что хитозан при концентрации 125–1000 мг/л подавлял рост 32 видов грибов, в то время как хитин (СД < 50%) при концентрации 1 мг/мл только 6. При этом эти 6 видов в равной или даже большей степени были чувствительными к хитозану, чем к хитину. Предполагают, что катионная форма первичных аминогрупп звеньев глюкозамина в полимерной цепи в результате электростатического взаимодействия с анионными группами на поверхности клеточной стенки приводит к ее дестабилизации и формированию пор, что в конечном итоге приводит к гибели патогена [19]. Сообщалось также, что соли алкилированного хитозана, у которых NH_2–группы частично преобразованы в четвертичные аммониевые, характеризовались большим положительным зарядом по сравнению с не модифицированным хитозаном [20]. У производного N,N,N-триметилхитозана, имеющего меньший объем заместителя по сравнению с N,N-диэтил-N-метилхитозаном, заряд оказался более доступным для взаимодействия с поверхностью клеточной стенки. Хлорид N,N,N-(триэтил)хитозана со степенью замещения 21% эффективнее ингибировал рост мицелия *B. cinerea* (Pers.) по сравнению с не модифицированным хитозаном (EC$_{50}$ – эффективная концентрация, вызывающая 50%-ное подавление роста микроорганизма – 449 и 859 мг/л соответственно), бла-

годаря наличию большего суммарного положительного заряда в структуре [1]. В работе [21] сообщалось об увеличении противогрибной активности производных хитозана в комплексе с ионами металлов, в частности, с ионами меди. Так же известно, что ионы кальция в концентрации 500 ммоль/л увеличивают ингибирующее действие антибиотиков по отношению к *B. cinerea* [22].

Цель работы – изучение влияния основных характеристик низкомолекулярного хитозана – молекулярной массы, степени дезацелирования и полидисперсности на прорастание конидий *B. cinerea*, а также ионов кальция и меди, используемых в растворе с хитозаном, на противогрибную активность.

МЕТОДИКА

Среды и условия культивирования. В работе использовали штамм *Botrytis cinerea* Persoon ВКМ F-2712. Штамм выращивали на агаризованной среде следующего состава (г/л): картофель – 200, глюкоза – 20, агар – 20 в течение 7 сут при 25°С. Готовую культуру хранили течение 1 мес при 4°С.

Получение производных хитозана. В работе использовали хитозан с ММ 100 и 60 кДа, СД 90 и 60% (Х100/90, Х100/60, Х60/90 и Х60/60), а также с ММ 2, 5, 13 кДа и СД 85, 85 и 98% – Х2/85, Х5/85 и Х13/98 соответственно и кватернизированное производное со степенью замещения (**СЗ**) 98%, синтезированное на основе хитозана ММ 20 кДа, СД 98% (КХ20/98) согласно методике описанной в работе [27].

Х60/90, Х20/98 и Х13/98 были получены в результате деполимеризации хитозана ММ 1000 кДа, СД 87% (ООО "Биопрогресс", Россия) с использованием неорганических кислот по методикам, изложенным в работе [23, 24] и Х100/90, Х5/85 и Х2/85 – с применением ферментных препаратов согласно методикам [25]. Образец Х2/85 дополнительно фракционировали методом ультрафильтрации. Хитозаны Х100/60 и Х60/60 получали реацетилированием образцов Х100/90 Х60/90, согласно методике [26]. Кватернизированное производное КХ20/98 получали по методике, описанной в работе [23]

Определение характеристик производных хитозана. Молекулярно-массовые характеристики хитозанов определяли методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии на хроматографе S 2100 ("Sykam", Германия) на колонке (7.8 × 300 мм) с Ultahydrogel-250 ("Waters", США) с предколонкой (4 × 3 мм) GFC-4000 ("Phenomenex", США).

Степень дезацетилирования определяли методом спектрометрии протонного ядерного магнитного резонанса (1Н-ЯМР) на спектрометре AVANCE III ("Bruker", Германия), рабочая частота по протону 600 МГц, температура 30°С. Образцы были приготовлены в H_2O + 10% D_2O, с добавлением соляной кислоты до полного растворения. Дзета-потенциал хитозанов определяли в 0.01М KCl, pH 7.0, при 25.0 ± 0.1°С, измерения проводили на приборе 90 Plus Particle Size Analyser ("Brookhaven Instruments Corporation", Vernon Hills, IL, США) с использованием дополнительной приставки Zeta-PALS. Среднее значение дзета-потенциала рассчитывали из 5 независимых измерений значений (как минимум), представленных с учетом среднего отклонения анализатора.

Получение растворов хитозана с ионами Ca^{2+} и Cu^{2+}. К навеске хитозана Х13/98, растворенной в 0.5%-ной уксусной кислоте (1.875 и 0.938 мг/мл), добавляли расчетное количество раствора соли (2.4%) $CaCI_2$ или $CuSO_4$. Конечная концентрация ионов Ca^{2+} 150 и 300 м.д., Cu^{2+} 75, 150 и 300 м.д. в растворах хитозанов.

Исследование прорастания спор. Анализ влияния хитозана и его производных на прорастание спор *B. cinerea* проводился в плоскодонных 96-луночных планшетах ("SPL Life Sciences", Korea) с использованием жидкой картофельно-глюкозной среды. Для получения конидий в пробирку с семисуточной культурой *B. cinerea* на картофельно-глюкозном агаре вносили 10 мл жидкой питательной среды и готовили суспензию, содержащую конидии и мицелий гриба. Суспензию фильтровали через стерильную вату для удаления остатков мицелия. Хитозан растворяли в 0.5%-ной уксусной кислоте в концентрации 15 мг/мл. Для определения концентрационной зависимости делали серию двукратных разведений, диапазон концентраций составил 0.234–1.875 мг хитозана/мл среды. Добавляли суспензию конидий в питательной среде, при этом концентрация конидий в лунке составляла 2.5×10^4 конидий/мл. Инкубировали в течение 4 ч при 25°С. Затем процесс прорастания останавливали добавляя в среду 50 мкл 2%-ного раствора параформальдегида. Индекс прорастания конидий определяли путем подсчета проросших конидий в поле зрения с использованием инвертированного микроскопа при 200-кратном увеличении. Проросшими считали конидии, ростковая трубка которых имела размер не менее чем диаметр конидии. Общее количество спор в поле зрения составляло 300–450. Долю проросших конидий (**$Д_{пр}$**) в поле зрения вычисляли по формуле:

$$Д_{пр} = a/(a+b) \times 100\%,$$

где a – количество проросших конидий в поле зрения, b – количество не проросших конидий в поле зрения.

Индекс прорастания конидий (**ИП**) рассчитывали по формуле:

$$ИП = Д_{пр\ о}/Д_{пр\ к} \times 100\%,$$

где $Д_{пр}$ о – доля проросших конидий в опыте, $Д_{пр}$ к – доля проросших конидий в контроле.

Изучение влияния производных хитозана на метаболическую активность гриба *B. cinerea* (колориметрический метод). Получение суспензии спор и серии разведений препаратов хитозана в 96-луночных планшетах проводили, как описано в методике изучения прорастания спор [27]. Подготовленные планшеты инкубировали в течение 24 ч при 25°С. Далее в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора хлорида йодонитротетразолия (5 мг/мл красителя, растворенного в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4) в присутствии 4 мг/мл 1-метоксифеназин-метосульфата и инкубировали в течение 4 ч при 37°С. Надосадочную жидкость аккуратно сливали, а к окрашенному осадку добавляли по 30 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Растворение осуществляли в течение 16 ч при 37°С при перемешивании (100 об/мин). Оптическую плотность в каждой лунке измеряли при 540 нм, используя фотометр микропланшетного формата (“Thermo Scientific Multiskan FC”, США). Измерения проводили трижды. Результаты получены с учетом контроля (влияние уксусной кислоты). Метаболическую грибную активность вычисляли по формуле:

$$\text{Метаболическая активность}(МА) = \\ = ОП_о/ОП_к \times 100\%,$$

где $ОП_о$ – среднеарифметическая величина показаний оптической плотности в опыте, $ОП_к$ – среднеарифметическая величина показаний оптической плотности в контроле.

Исследование влияния хитозана на рост гриба *B. cinerea*. Противогрибную активность препарата хитозана оценивали *in vitro* по отношению к *B. cinerea* по методике [28]. Хитозан растворяли в 0.5%-ной уксусной кислоте и вносили в расплавленную агаризованную картофельно-глюкозную среду до достижения концентрации 0.234, 0.469, 0.938 и 1.875 мг/мл. Приготовленные среды затем переносили в стерильные чашки Петри диаметром 70 мм. После застывания среды в центр испытуемых чашек помещали диск диаметром 7 мм с суточной культурой *B. cinerea* и инкубировали при 25°С. Изучение завершали, когда мицелий гриба достигал края чашки Петри в контрольном варианте (без добавления хитозана). Противогрибную активность вычисляли по формуле:

$$\text{Противогрибная активность}(\mathbf{ПА}) = \\ = (1 - D_о/D_к) \times 100\%,$$

где $D_о$ – диаметр колонии в опытном варианте, мм, $D_к$ – диаметр колонии в контрольном варианте, мм.

Были выполнены три повторности каждого теста, для расчета брали среднеарифметическое значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хитозаны с ММ 200–1000 кДа характеризуются низкой (≪1 мг/мл) растворимостью в водных растворах при pH 6, что обусловлено практически полным отсутствием в их структуре протонированных аминогрупп и агрегацией молекул за счет внутри- и межмолекулярных водородных связей. При применении в качестве растворителя органических кислот (уксусной, молочной и др.) образуются вязкие растворы хитозанов с ММ более 200 кДа. Обычно для снижения вязкости этих растворов и увеличения его растворимости осуществляют реакцию деполимеризации полимерной цепи хитозана. Для изучения влияния основных характеристик биополимера на прорастание конидий *B. cinerea* методами химической и ферментативной деполимеризации были получены производные низкомолекулярного хитозана с ММ 2–100 кДа, различающиеся по количеству аминогрупп (СД) после реацетилирования (табл. 1).

Оценку ингибирующего действия хитозанов на прорастание спор *B. cinerea* проводили в плоскодонных 96-луночных планшетах. В данном эксперименте изучали ИП в диапазоне концентраций хитозанов 0.015–1.875 мг/мл. Производные с ММ 100 и 60 были взяты с СД 60 и 90 (рис. 1а).

Следует отметить, что производное Х60/90 (рис. 1а, вариант *4*) с большим содержанием протонированных аминогрупп (при pH 5.6) характеризовалось большим положительным зарядом и ИП конидий оказался ниже 50% во всем диапазоне исследуемых концентраций, а у Х60/60 (рис. 1а, вариант *3*) ИП снижался, только начиная с концентрации 0.029 мг/мл. Однако, даже при максимальной рабочей концентрации 1.875мг/мл для этих двух хитазанов не наблюдалось полного подавления прорастания конидий. Для Х100/90 и Х100/60 ИП резко уменьшался при концентрации от 0.234 до 1.875 мг/мл, что коррелировало со снижением ММ от 100 до 60 кДа и увеличением СД от 60 до 90%.

Уменьшение ММ хитозана до 2 и 13 кДа при СД 85 и 98% эффективно влияло на прорастание конидий *B. cinerea* во всем диапазоне исследуемых концентраций (рис. 1б, варианты 1 и 3).

ИП конидий менее 50% отмечали для хитозана Х5/85 в диапазоне концентраций 0.117–1.875 мг/мл (рис. 1б, вариант 2). Как Х5/85, так и Х2/85 полностью ингибировали прорастание конидий *B. ci-*

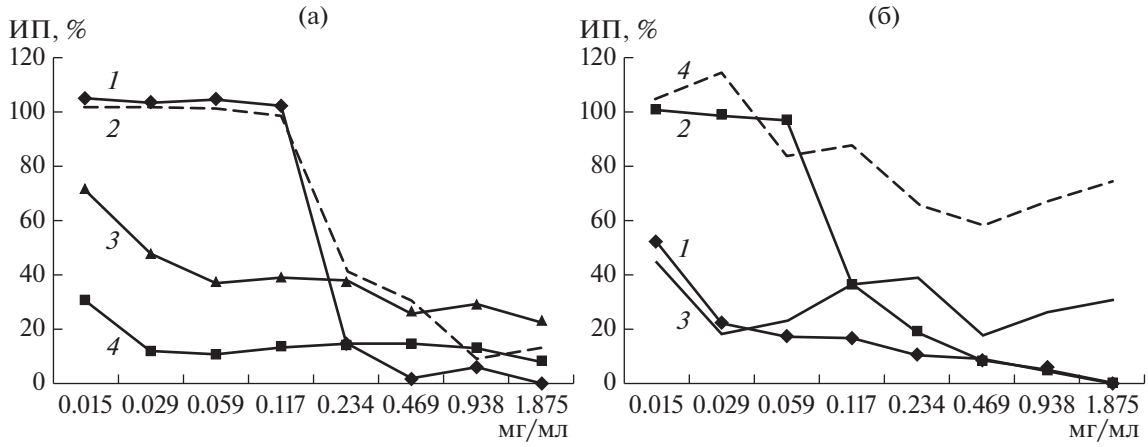

Рис. 1. Зависимость индекса прорастания конидий от концентрации производного хитозана: а – X100/60 (*1*), X100/90 (*2*), X60/60 (*3*) и X60/90 (*4*); б – X2/85 (*1*), X5/85 (*2*) X13/98 (*3*) и KX20/98 (*4*) при обработке *B. cinerea*.

nerea при максимальной концентрации 1.875 мг/мл. Интересно отметить, что X5/85 и X2/85 с одинаковой СД, полидисперсность и близкие значения ММ, но отличались по способу выделения, и проявляли противогрибное действие при концентрациях, различающихся на порядок. Можно предположить, что это связано с потерей активной составляющей в структуре X2/85, отвечающей за проявляемую активность [29]. Следует отметить, что хитозан X2/85 был получен дополнительным фракционированием гидролизата хитозана с использованием метода ультрафильтрации.

При сравнении действия образцов хитозана X5/85 и X13/98, которые характеризовались полидисперсностью 2 и 2.5 соответственно, было показано, что X13/98 эффективнее подавлял рост конидий *B. cinerea*. Можно предположить, что это связано с более высокой растворимостью, обусловленной большей СД и полидисперсностью. Обычно с увеличением полидисперсности в условиях гидролиза кислотой возрастает количество коротких молекулярных фрагментов, ослабляющих межмолекулярные взаимодействия в структуре. Таким образом, полученные результаты подтверждали влияние обеих характеристик хитозана на проявляемый биологический эффект.

Ранее сообщалось, что кватернизированные производные низкомолекулярного хитозана характеризуются более высокой противогрибной активностью по сравнению с хитозаном [30]. Это объясняли структурой вводимого заместителя при четвертичном атоме азота. Кватернизированное производное, используемое в данной работе, не оказывало такого положительного эффекта. Оказалось, что при сопоставимых значениях суммарного положительного заряда для производных KX20/98 и X13/98 ИП конидий оказался значительно выше 50% для всех используемых концентраций (рис. 1б, вариант 4 и 3). Полученные результаты можно объяснить уда-

Таблица 1. Физико-химические характеристики производных хитозана

Производное хитозана	ММ, кДа	СД, %	M_w/M_n	Z-потенциал, мВ
X100/90	100	90	2.7	24 ± 2.5
X100/60	100	60	2.7	15 ± 2.8
X60/90	60	90	2.0	25 ± 2.7
X60/60	60	60	2.0	19 ± 2.0
X20/98	20	98	1.9	35 ± 2.0
X13/98	13	98	2.5	35 ± 3.5
X5/85	5	85	2.0	32 ± 2.5
X2/85	2	85	2.0	32 ± 2.5
KX20/98	20*	98**	Не определяли	33 ± 5.0

* ММ хитозана, на основе которого было получено кватернизированное производное; ** – степень замещения (кватернизации), M_w – средневесовая, M_n – среднечисловая молекулярная масса, M_w/M_n – полидисперсность.

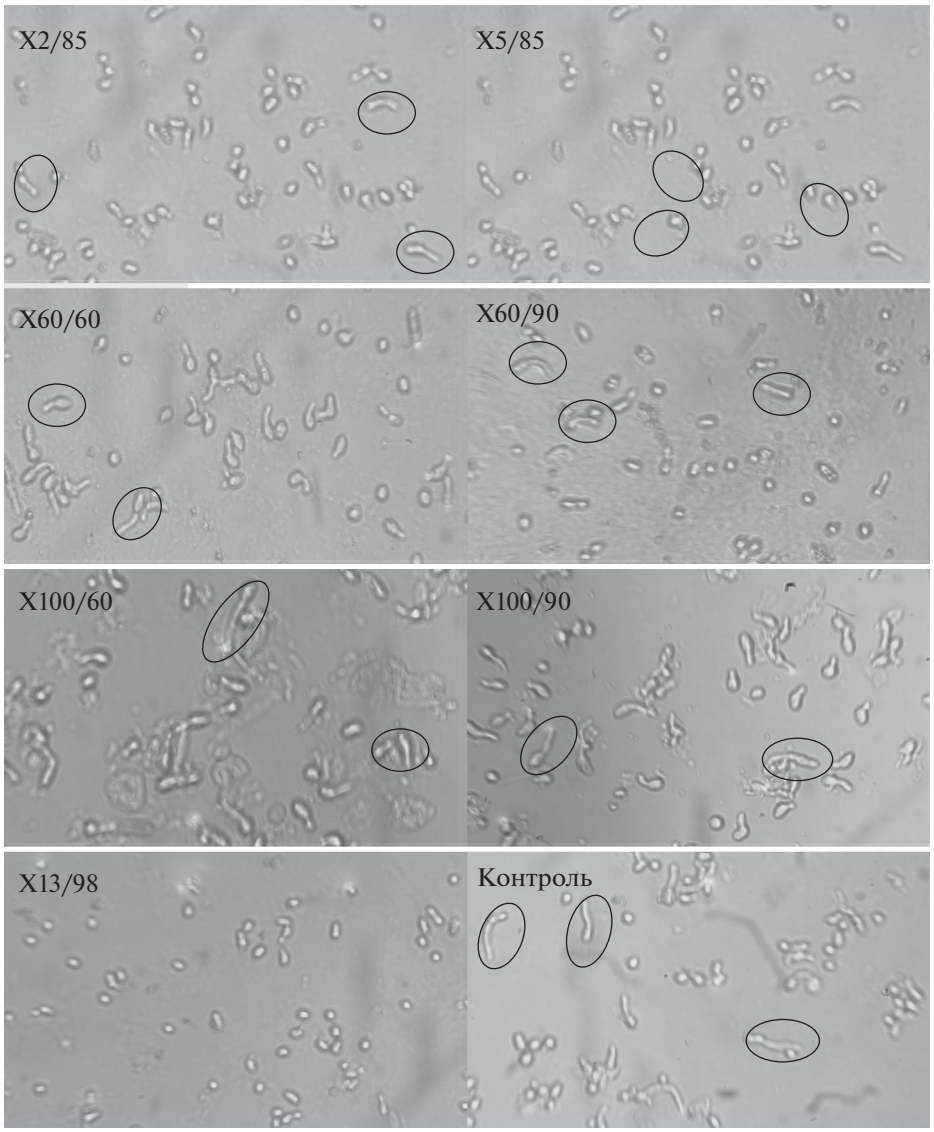

Рис. 2. Влияние производных хитозана в концентрации 0.015 мг/мл на прорастание конидий *B. cinerea* при 4-часовой инкубации (увеличение в 200 раз).

ленностью положительного заряда на четвертичном атоме азота от главной полисахаридной цепи на расстояние 0.5–0.6 нм алкильного заместителя ($-CH_2-CH(OH)-CH_2-$) [31], что возможно препятствует взаимодействию с отрицательно заряженными группами на поверхности клеточной стенки гриба. В то же время протонированные аминогруппы хитозана в производных X2/85, X5/85 и X13/98 расположены значительно ближе к основной цепи биополимера, поэтому они оказывали более сильное ингибирующее действие.

При визуальном контроле с помощью световой микроскопии действия хитозанов с ММ от 2 до 100 кДа на прорастание конидий гриба *B. cinerea*, наибольший ингибирующий эффект был отмечен для производного X13/98 (рис. 2, X13/98), в то время как в остальных вариантах опыта и контроле наблюдалось значительное увеличение ростовых трубок конидий гриба.

Влияние хитозанов на метаболическую активность гриба *B. cinerea* оценивали с использованием модифицированного тетразолиевого метода (**МТТ-тест**). Использованный в работе колориметрический метод оценки с помощью соли тетразолия (йоднитротетразолия хлорида) физиологического состояния клеток по активности НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз, основан на ее восстановлении и переходе в водонерастворимую форму – формазан. По количеству образующегося формазана (пурпурное окрашивание) оценивали метаболическую активность клеток. Снижение интенсивности окраски свидетельствовало о

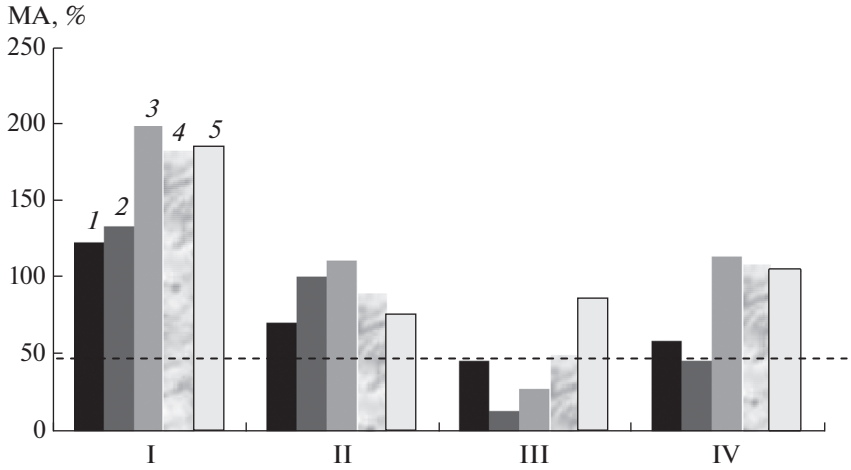

Рис. 3. Зависимость изменения метаболической активности гриба *B. cinerea* от концентрации (мг/мл) от концентрации (мг/мл): *1* – 1.875; *2* – 0.938; *3* – 0.469; *4* – 0.234; *5* – 0.117, при обработке хитозаном: I – X20/98, II – KX20/98, III – X13/98, IV-X2/85.

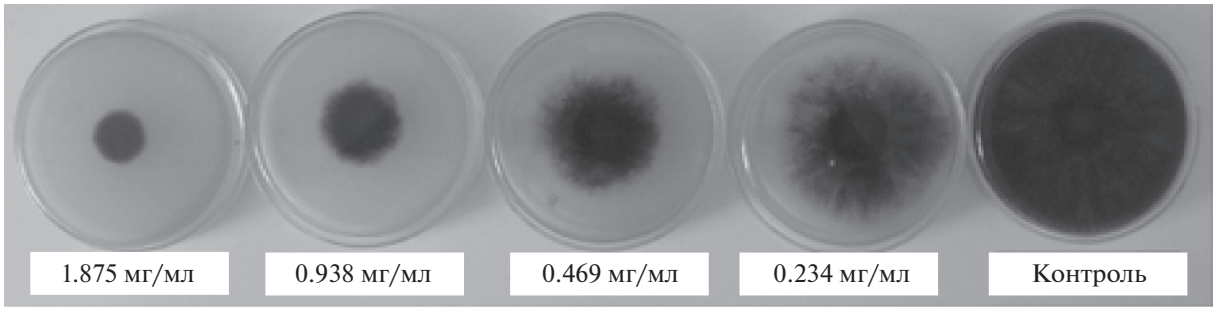

Рис. 4. Рост *B. cinerea* на агаризованной среде с различной концентрацией производного хитозана X13/98 при инкубации в течение 168 ч.

повреждении грибной клетки. Для данного метода были использованы те производные хитозана, которые проявили себя в качестве ингибиторов прорастания спор в предыдущем эксперименте. Производные X60/60, X60/90, X100/60 и X100/90 не оказывали эффективного противогрибного действия. Можно предположить, что в результате увеличения времени инкубации с 4 до 24 ч происходило разрушение хитозановой пленки, покрывающей конидии *B. cinerea*, гидролитическими ферментами, синтезируемыми грибной культурой.

Из полученных результатов также следовало, что эффект от действия производного хитозана KX20/98 приблизительно в два раза выше (рис. 3, вариант II) чем от не модифицированного хитозана X20/98 (рис. 3, вариант I), однако для обоих производных ИП конидий был значительно выше 50% (в интервале изученых концентраций). Самым эффективным производным, проявившим максимальную ингибирующую активность, оказался хитозан с ММ 13 и СД 98% в концентрации 0.938 мг/мл, что согласовывалось с результатами предыдущего эксперимента. В связи с этим в дальнейшем изучали хитозан X13/98.

Противогрибную активность хитозана X13/98 по отношению к *B. cinerea* оценивали *in vitro* по скорости роста мицелия. Диапазон изученных концентраций хитозана составил 0.234–1.875 мг/мл. На 168 ч роста культуры *B. cinerea*, когда в контрольном варианте мицелий гриба достигал краев чашки Петри, противогрибная активность оказалась ниже 50% при концентрации хитозана в агаризованной среде, 1.875 и 0.938 мг/мл (рис. 4).

Ранее сообщалось, что неорганические соли оказывают влияние на рост мицелия *B. cinerea* [32]. Изучение влияния ионов Ca^{2+} на *B. cinerea* показало, что соли кальция оказывали тормозящее действие (на 23%) на рост гриба (при концентрации 300 м.д.) [33]. В этих экспериментах были использованы растворы хитозана X13/98 с ионами

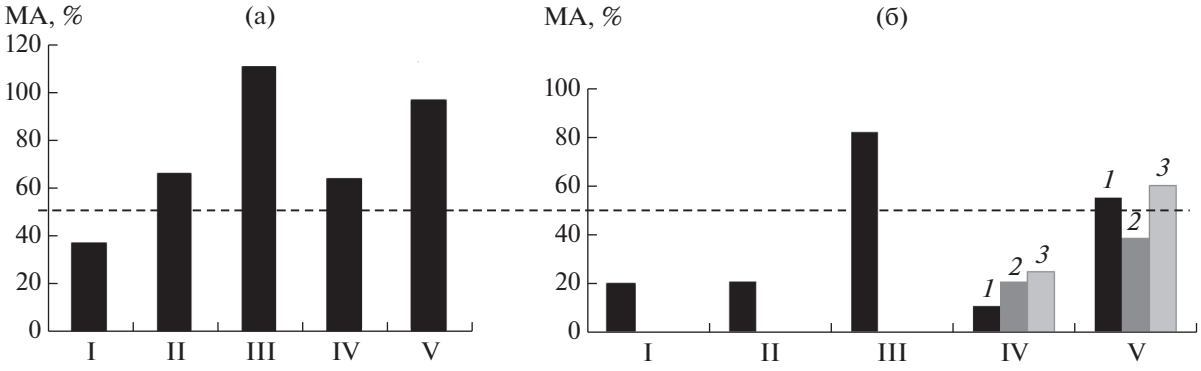

Рис. 5. Изменение метаболической активности гриба *B. cinerea* при обработке хитозаном, а также под вздействием ионов Ca^{2+} и Cu^{2+}: а – I – контроль X13/98, II – комплекс X13/98 с Ca^{2+} (300 м.д.), III – Ca^{2+}(300 м.д.), IV – комплекс X13/98 с Cu^{2+} (300 м.д.), V – Cu^{2+}(300 м.д.); б – I – контроль (X13/98), II – комплекс X13/98 с Ca^{2+} (150 м.д.), III – Ca^{2+}(150 м.д.), IV – комплекс X13/98 с Cu^{2+}: *1* – 75, *2* – 150, *3* – 300 м.д.; V – Cu^{2+}: *1* – 75, *2* – 150, *3* – 300 м.д.

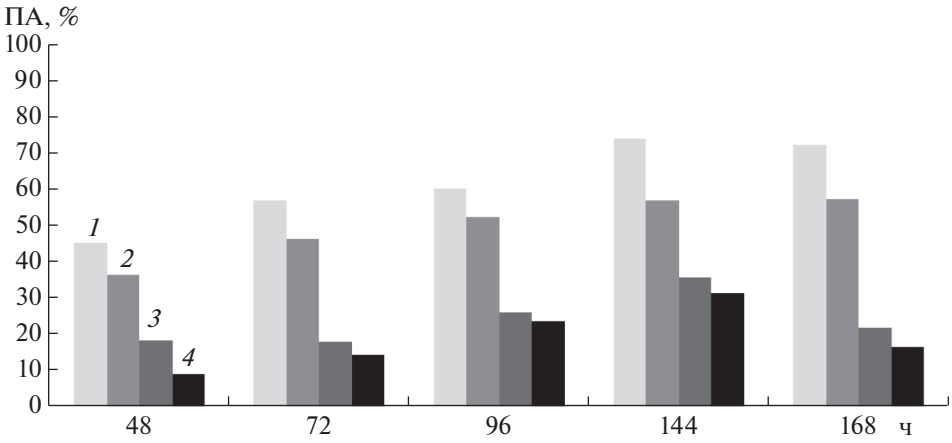

Рис. 6. Изменение противогрибной активности во времени при различных концентрациях хитозана X13/98 (мг/мл): *1* – 1.875, *2* – 0.938, *3* – 0.469, *4* – 0.234.

Ca^{2+} и Cu^{2+} в концентрациях 150 и 300 м.д. Как видно на рис. 5а II, добавление в раствор X13/98 (1.875 мг/мл) ионов Ca^{2+} (300 м.д.) не увеличивало противогрибную активность, а метаболическая активность оказалась выше чем в контроле (рис. 5а I). Можно предположить, что это связано с появлением тонкодисперсной взвеси, уменьшающей прозрачность тестируемых растворов X13/98 в присутствии ионов Ca и Cu, и как следствие завышающей фиксируемую оптическую плотность. Похожий результат наблюдали при снижении концентрации ионов Ca^{2+} (150 м.д.) в растворе X13/98 (0.938 мг/мл) (рис. 5б II). Производное X13/98, содержащее ионы меди (75, 150 и 300 м.д.) оказывало существенное противогрибное действие (рис. 5б IV), а величина метаболической активности по хитозану была в два раза ниже, чем в контрольном варианте. При увеличении концентрации ионов меди до 300 м.д. в растворе X13/98 метаболическая активность практически не отличалась от величины, фиксируемой в контроле по хитозану (рис. 5б V). Следует отметить, что использование качестве контроля растворов, содержащих только ионы кальция или меди в концентрации 150 и 300 м.д., стимулировало рост *B. cinerea* (метаболическая активность более 50%) (рис. 5б).

В работе установлено, что показатели ИП зависели от времени инкубации культуры в присутствии производных хитозана. После 4 ч инкубации прорастание конидий ингибировали как хитозаны с ММ 60 кДа, так и ММ 2 и 13 кДа. Увеличение времени инкубации до 24 ч привело к тому, что значительное ингибирующее действие проявил только хитозан X13/98 при концентра-

циях от 0.234 до 1.875 мг/мл. Было показано, что при использовании X13/98 в комплексе с ионами меди наблюдался синергетический эффект. Так, через 7 сут роста при использовании *in vitro* X13/98 в концентрации 1.875 мг/мл противогрибная активность составила 72.6% (рис. 6).

Таким образом, с помощью визуального изучения с помощью световой микроскопии, колориметрического метода анализа и определения скорости роста мицелия было установлено влияние основных характеристик низкомолекулярного хитозана на рост *B. cinerea*. Для хитозанов с ММ 2–13 кДа, СД 85–98% и полидисперсностью 2–2.5 регистрировали ИП конидий менее 50% при концентрации 0.117–1.875 мг/мл. Метаболическая активность гриба при действии хитозана ММ 13 кДа, СД 98% (0.938 мг/мл) и его комплекса с ионами меди (75 м.д.) соответствовала 20 и 11%. Это позволяет рекомендовать хитозан с ММ 13 кДа и СД 98% и его комплекс с ионами меди для использования в качестве перспективного противогрибного агента по отношению к *B. cinerea*.

Авторы выражают благодарность С.А. Лопатину (лаборатория инженерии биополимеров, Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН) за проведение высокоэффективной гель-проникающей хроматографии хитозанов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tan W., Li Q., Dong F., Wei L., Guo Z.* // Int. J. Biol. Macromol. 2016. V. 92. P. 293-298.
2. *Badawy M.E.I., Rabea E.I., Ismail R.I.A.* // Curr. Bioact. Compd. 2015. V. 11. № 4. P. 264–273.
3. *Abu Qamar S., Moustafa K., Tran L.-S.P.* // Crit. Rev. Biotechnol. 2017. V. 37. № 2. P. 262–274.
4. *Badawy M.E.I., Rabea E.I.* // Int. J. Carbohydr. Chem. V. 2011, Article ID 460381, 29 pages doi 10.1155/2011/460381
5. *Sharp R.* // Agronomy. 2013. V. 3. № 4. P. 757–793.
6. *Ghormade V., Pathan E.K., Deshpande M.V.* // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 104 (Pt B). P. 1415–1421.
7. *Kean T., Thanou M.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2010. V. 62. № 1. P. 3–11.
8. *Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B., Bhanu A.N.* // Adv. Plants Agric. Res. 2014. V. 1. № 1. P. 1–8.
9. *Yang L.-Y., Zhang J.-L., Bassett C.L., Meng X.-H.* // LWT – Food Sci. Technol. 2012. V. 46. № 1. P. 254–259.
10. *Seyfarth F., Schliemann S., Elsner P., Hipler U.-C.* // Int. J. Pharm. 2008. V. 353. № 1–2. P. 139–148.
11. *Yoonkyung P., Kim M.-H., Park S.-C., Cheong H., Jang M.-K., Nah J.-W., Hahm K.-S.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. № 10. P. 1729–1734.
12. *Badawy M.E.I., Rabea E.I.* // Biol.Technol. 2009. V. 51. № 1. P. 110–117.
13. *Rahman M.H., Hjeljord L.G., Aam B.B., Sørlie M., Tronsmo A.* // Eur. J. Plant Pathol. 2015. V. 141. № 1. P. 147–158.
14. *Лялина Т.С., Терешина В.М., Варламов В.П.* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2017. № 3(1). С. 110–113.
15. *Aranaz I., Mengíbar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras Á.* // Curr. Chem. Biol. 2009. V. 3. № 2. P. 203–230.
16. *Badawy M.E.I.* // J. Appl. Polym. Sci. 2010. V. 117. № 2. P. 960–969.
17. *Falcón A.B., Cabrera J.C., Costales D., Ramírez M.A., Cabrera G., Toledo V., Martínez-Téllez M.A.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 24. № 1. P. 103–112.
18. *Allan C.R., Hadwiger L.A.* // Experimental Mycol. 1979. V. 3. № 3. P. 285–287.
19. *Choi B.-K., Kim K.-Y., Yoo Y.-J., Oh S.-J., Choi J.-H., Kim C.-Y.* // Int. J. Antimicrob. Agent. 2001. V. 18. № 6. P. 553–557.
20. *Sadeghi A.M.M., Dorkoosh F.A., Avadi M.R., Saadat P., Rafiee-Tehrani M., Junginger H.E.* // Int. J. Pharm. 2008. V. 355. № 1–2. P. 299–306.
21. *Liu W., Qin Y., Liu S., Xing R., Yu H., Chen X., Li K., Li P.* // Carbohydr. Polym. 2017. V. 160. № 7. P. 97–105.
22. *Hudecova D., Varečka L., Vollek V., Betina V.* // Folia Microbiol. 1994. V. 39. № 4. P. 269–275.
23. *Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Варламов В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология 2016. Т. 52. № 2. С. 237–241.
24. *Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Лопатин С.А., Карташов М.И., Арсланова Л.Р., Джавахия В.Г., Варламов В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 1. С. 68–73.
25. *Хасанова Л.М., Ильина А.В., Варламов В.П., Синицына О.А., Синицын А.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 422–428.
26. *Ильина А.В., Варламов В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 6. С. 688–692.
27. *Park Y., Kim M.-H., Park S.-C., Cheong H., Jang M.-K., Nah J.-W., Hahm K.-S.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. № 10. P. 1729–1734.
28. *Qiu M., Wu C., Ren G., Liang X., Wang X., Huang J.* // Food Chem. 2014. V. 155. P. 105–111.
29. *Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 224–228.
30. *Guo Z., Xing R., Liu S., Zhong Z., Ji X., Wang L., Li P.* // Carbohydr. Polym. 2008. V. 71. P. 694–697.
31. *Yevlampieva N.P., Gubarev A.S., Gorshkova M.Yu., Okrugin B.M., Ryumtsev E.I.* // J. Polym. Res. 2015. V. 22. P. 166.
32. *Yoon C.S., Yeoung Y.R., Kim B.S.* // Kor. J. Hort. Sci. Technol. 2010. V. 28. № 6. P. 1072–1077.
33. *Boumaaza B., Benkhelifa M., Belkhoudja M.* // Int. J. Microbiol. V. 2015. Article ID 572626, http://dx.doi.org/10.1155/2015/572626

Of the Main Characteristics of Low Weight Chitosan on the Growth of Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*

N. V. Karpova[a], B. Ts. Shagdarova[a], T. S. Lyalina[a], A. V. Il'ina[a], V. M. Tereshina[b], and V. P. Varlamov[a]

[a] *Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

[b] *Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: ashatanr@mail.ru*

Received October 29, 2018; revised January 14, 2019; accepted February 20, 2019

The influence of the main characteristics of low molecular weight chitosan, obtained as a result of enzymatic and chemical hydrolysis, with a molecular mass (MM) of 2–100 kDa, a deacetylation degree of 60–98% and a polydispersity of 1.9–2.7 on the growth of *Botrytis cinerea* was investigated. The greatest inhibitory effect on the germination process of the fungus (conidia germination index less than 50%) was provided by chitosans samples with MM 2–13 kDa, a deacetylation degree of 85–98% and polydispersity 2–2.5, especially chitosan with MM 13 kDa, a deacetylation degree of 98% at concentration 0.938 mg/ml had a significant inhibitory effect on the growth of the mycelium of the fungus. This sample of chitosan and its complex with copper ions (75 ppm) significantly suppressed the metabolic activity of the fungus (up to 20 and 10%, respectively), which indicates that they are promising as antifungal agents for the development of fungicidal preparations.

Keywords: low molecular weight chitosan, molecular weight, degree of deacetylation, polydispersity, *Botrytis cinerea*, antifungal activity