ISSN 0555-1099

Том 60, Номер 2

Март - Апрель 2024

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ и МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

300 лет Российская Академия Наук

НАУКА

1727

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 2, 2024

Хитозан и его производные в агробиотехнологии, медицине и промышленности (РосХит 2023)
В. П. Варламов, И. В. Яковлева 121

Функциональные покрытия на основе хитозана для послеуборочной обработки томатов
А. В. Ильина, Б. Ц. Шагдарова, А. А. Зубарева, В. П. Варламов 123

Функциональные производные хитозана, растворимые в нейтральных средах – средство доставки лекарственных веществ и генетического материала: получение и свойства
М. Ю. Горшкова, Э. С. Григорян, И. Ф. Волкова 134

Создание антибактериального композиционного аэрогеля биомедицинского назначения на основе комплекса альгинат–хитозан и карбоната кальция
Н. А. Горшкова, О. С. Бровко, И. А. Паламарчук, А. Д. Ивахнов, Н. И. Богданович, Т. Я. Воробьева 143

Выделение хитозан-меланинового комплекса из подмора мухи черная львинка и получение на его основе нановолокнистых материалов
А. Ш. Хайрова, Н. А. Сажнев, Д. В. Коробовская, С. А. Лопатин, Н. Р. Кильдеева, В. П. Варламов 151

Влияние хитозана на способность липополисахарида взаимодействовать с клетками иммунной системы
В. Н. Давыдова, А. В. Володько, В. И. Горбач, С. В. Чусовитина, Т. Ф. Соловьева, И. М. Ермак 158

Получение хитозана из хитинсодержащего сырья Узбекистана и исследование антимикробных свойств
Р. Ю. Милушева, Г. Д. Ахымбетова, С. Ш. Рашидова 167

Биологическая активность дисперсий наночастиц хитозана, полученных методом дробного осаждения
Э. В. Попова, Н. С. Домнина, И. И. Новикова, Н. М. Коваленко, И. Л. Краснобаева, И. М. Зорин 177

Влияние конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами и бактерий *Bacillus subtilis* на активность защитных белков и устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans*
Л. Г. Яруллина, Г. Ф. Бурханова, В. О. Цветков, Е. А. Черепанова, А. В. Сорокань, Е. А. Заикина, И. С. Марданшин, И. Я. Фаткуллин, И. В. Максимов, Ж. Н. Калацкая, Н. А. Еловская, Е. И. Рыбинская 183

Влияние штаммов *Bacillus subtilis* в сочетании с салицилатом хитозана на активность пероксидазы и каталазы в листьях пшеницы при инфицировании возбудителем темно-бурой пятнистости *B. sorokiniana*
И. И. Новикова, Э. В. Попова, Н. М. Коваленко, И. Л. Краснобаева 193

Биологическая эффективность полифункциональных комплексов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и салицилата хитозана при возделывании пшеницы
И. И. Новикова, Л. Е. Колесников, Э. В. Попова, Б. А. Хассан, Н. С. Приятькин, Д. Ю. Радишевский, И. Л. Краснобаева, Л. А. Хигерович, Ю. Р. Колесникова 205

CONTENTS

Vol. 60, No. 2, 2024

Chitosan and its derivatives in agrobiotechnology, medicine and industry (RosChit 2023)
V. P. Varlamov, I. V. Yakovleva 121

Chitosan-based Functional Coatings for Postharvest Processing of Tomatoes
A. V. Il'ina, B. Ts. Shagdarova, A. A. Zubareva, V. P. Varlamov 123

Functional Derivatives of Chitosan, Soluble in Neutral Medium as Drugs and Genetic Material Carrier: Preparation and Properties
M. Yu. Gorshkova, E. S. Gigoryan, I. F. Volkova 134

Preparation of Antibacterial Composite Aerogel for Biomedical Purposes Based on Alginate–Chitosan Complex and Calcium Carbonate
N. A. Gorshkova, O. S. Brovko, I. A. Palamarchuk, A. D. Ivahnov, N. I. Bogdanovich, T. Ya. Vorob'eva 143

Isolation of Chitosan-Melanin Complex from Black Soldier Fly Adults and Obtaining Nanofibrous Materials Based on It
A. Sh. Khayrova, N. A. Sazhnev, D. V. Korobovskaya, S. A. Lopatin, N. R. Kildeeva, V. P. Varlamov 151

Influence of Chitosanon on the Ability of LPS to Interact with Cells of the Immune System
V. N. Davydova, A. V. Volodko, V. I. Gorbach, S. V. Chusovitina, T. F. Solovyeva, I. M. Ermak 158

Obtaining Chitosan from Chitine-Containing Uzbekistan Raw Materials and Research of Antimicrobial Properties
R. Yu. Milusheva, G. D. Akhymbetova, S. Sh. Rashidova 167

Biological Activity of Chitosan Nanoparticle Dispersions Produced by Fractional Precipitation
E. V. Popova, N. S. Domnina, I. I. Novikova, N. M. Kovalenko, I. L. Krasnobaeva, I. M. Zorin 177

Effect of Chitosan Conjugates with Oxycinnamic Acids and *Bacillus subtilis* Bacteria on the Activity of Protective Proteins and Resistance of Potato Plants to *Phytophthora infestans*
L. G. Yarullina, G. F. Burkhanova, V. O. Tsvetkov, E. A. Cherepanova, A. V. Sorokan, E. A. Zaikina, I. S. Mardanshin, I. Y. Fatkullin, I. V. Maksimov, J. N. Kalatskaja, N. A. Yalouskaya, E. I. Rybinskaya 183

Effect of *Bacillus subtilis* in Combination with Chitosan Salicylate on Peroxidase and Catalase Activity in *B. sorokiniana* Infected Wheat
I. I. Novikova, E. V. Popova, N. M. Kovalenko, I. L. Krasnobaeva 193

The Biological Efficiency of Multifunctional Complexes Based on *Bacillus subtilis* Strains and Chitosan Salicylate in Wheat Cultivation
I. I. Novikova, L. E. Kolesnikov, E. V. Popova, B. A. Hassan, N. S. Priyatkin, D. Yu. Radishevskiy, I. L. Krasnobaeva, L. A. Higerovich, Yu. R. Kolesnikova 205

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 121–122

ХИТОЗАН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ В АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ, МЕДИЦИНЕ И ПРОМЫШЛЕННОСТИ (РОСХИТ 2023)

В настоящий выпуск журнала “Прикладная биохимия и микробиология” включены статьи, которые были представлены в рамках Шестнадцатой Всероссийской конференции с международным участием “Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана” (https://roschit23.ru/), проходившей в сентябре 2023 года в г. Владивостоке (РосХит-2023). Юбилейная конференция была посвящена 40-летию первой конференции по хитину и хитозану, состоявшейся во Владивостоке в сентябре 1983 г. (Первая Всесоюзная научно-техническая конференция по производству и использованию хитина и хитозана из панциря криля и других ракообразных), которая проводилась на базе крупнейшего научного учреждения региона — Института химии ДВО РАН (ИХ ДВО РАН).

Итоги «РосХит-23» показали, что в последнее десятилетие разработки в области хитинологии были посвящены источникам хитина, получению, анализу и свойствам хитозана и его производных, хитинолитическим ферментам, применению хитина, хитозана и их производных, которые становятся все более востребованными. Особенно хитозан стал востребован в сфере медицины, благодаря его биосовместимости и биодеградируемости в организме, что обусловлено воздействием ферментов слизистой оболочки и кишечной микрофлоры человека.

В настоящее время вследствие квоты на вылов и охраны загрязнения морских ареалов сырьевая база для производства хитозана в нашей стране является весьма ограниченной. Сведения о запуске в Мурманске комплексной схемы утилизации отходов промышленной переработки камчатского краба и краба-стригуна были представлены в докладе Новикова В. Ю. (ПИНРО им. Н. М. Книповича, Мурманск). Было отмечено, что это стало возможно благодаря деятельности ООО «Антей-Север», так как была организована переработка живых крабов на береговом предприятии.

Новые источники сырья были представлены исследователями из Узбекистана — это гидробионты соленых водоемов Приаралья. Вид беспозвоночных *Artemia parthenogenetica*, представленных в соленых водоемах Приаралья, становится сейчас доминантом зоопланктона вследствие высокой минерализации водной среды. Рачки *Artemia parthenogenetica* стали единственным, успешно размножающимся видом в Аральском море, запасы которого в настоящее время достигают промысловых объемов.

Проведенные Рашидовой С. Ш. с соавт. (Институт химии и физики полимеров АН РУз, Ташкент, Узбекистан) исследования показали, что выделенный из цист *A. parthenogenetia* Аральского моря хитозан обладает хорошей растворимостью (82%) и степенью дезацетилирования — 73%. В перспективе это позволит использовать его как в медицине, так и в АПК. Авторы работ из Узбекистана представили также доклады по получению хитина и хитозана из отходов традиционного для страны шелкового производства. Это тем более актуально, поскольку речь идет об отходах возобновляемого местного сырья в достаточных количествах: 10000–15000 т/г, остающихся при переработке натурального шелка. Куколки тутового шелкопряда *Bombyx mori* также могут быть возобновляемым источником для выделения природного полисахарида и получения из него модификацией не менее востребованного хитозана. В продолжающемся цикле работ Института химии и физики полимеров АН Узбекистана (Рахманова В. Н. и др.) достигнут новый важный этап в получении производных хитозана: впервые синтезирован сульфат хитозана на основе сырья из *Bombyx mori*.

Следует отметить, что также используются быстро возобновляемые альтернативные источники хитозана из насекомых: хитозан из личинок мух черная львинка (*Hermetia illucens*), подмора пчел и др. Особую популярность сегодня приобретают новые биоматериалы, получаемые, например, из комплексов хитозана с меланином. Доступность хитин-меланиновых комплексов, получаемых на поздних стадиях (куколки, имаго) онтогенеза насекомого *Hermetia illucens,* позволила группе авторов из ФИЦ Биотехнологии РАН и РГУ им. А. Н. Косыгина разработать новые электроформованные изделия из хитозана — нановолокна из хитозан-меланинового комплекса со средним диаметром 250 нм, устойчивые в водных растворах. Такие волокна можно использовать в качестве раневых покрытий, а также в тканевой инженерии для пролиферации живых клеток.

Лидирующим направлением в тканевой инженерии сегодня является использование биомиметических гидрогелевых каркасов. Решение этой задачи основывается, в том числе, на разработке предназначенных для технологий 3D-печати гидрогелевых чернил, в качестве которых могут выступать композиции, содержащие хитозан. Кильдеевой Н. Р. с соавт.(Российский государственный университет имени А. Н. Косыгина, ФИЦ

Биотехнологии РАН) удалось оптимизировать условия перехода гидрогелей полисахаридов от текучих полимерных систем к получению упругого тела матрикса, форма которого задана и адаптирована для считывания 3D-биопринтером, что создает перспективы для выпуска трехмерных искусственных матриксов, полностью совместимых с живыми тканями.

Представленный в докладах участников конференции РосХит-23 спектр медицинских приложений хитозана отличался широтой и разнообразием. В работах Привар Ю. О., Братская С. Ю. с соавт. (Института химии ДВО РАН) представлены новые способы получения супермакропористых биорезорбируемых материалов на основе хитозана и карбоксиметилхитозана. Полученные материалы могут применяться для трехмерного культивирования опухолевых и нормальных клеток человека, а также тестирования *in vitro* эффективности противоопухолевых препаратов и комбинированных методов лечения опухолевых заболеваний.

Большой интерес представляет также медицинское направление, связанное с надежно подтвержденными улучшенными гемостатическими свойствами производных хитозана. В работе Лунькова А. П. с соавт. (ФИЦ Биотехнологии РАН) продемонстрирован успешный синтез методом клик-химии перспективного производного хитозана, содержащего аминокапроновую кислоту. Авторы работы предположили, что за счет улучшенной адгезии и антифибринолитической активности аминокапроновой кислоты, будет наблюдаться усиление гемостатической активности хитозана, что откроет перспективу использования производного, например, как основы инновационной аэрозольной пены для заживления кожи после ожогов и др.

К новым биоматериалам предъявляются жесткие требования, такие как биоразлагаемость, высокие прочностные характеристики, биосовместимость. Исследования, проведенные в ННГУ им. Н. И. Лобачевского (Апрятина К. В. с соавт.) показали перспективность использования в биомедицине разработанных ими пленок блок-сополимеров на основе рыбного коллагена и хитозана с молекулярной массой 330 кДа, полученных из крабовых панцирей (ООО “Биопрогресс”, Московская обл., Россия).

В настоящем сообщении перечислена лишь небольшая часть работ, имеющих прикладное значение, авторы которых представили доклады на конференции. В рамках РосХит-2023 были представлены результаты научных проектов из разных регионов России, в том числе поддержанные грантами Российского научного фонда.

Президент Российского хитинового общества
В. П. Варламов

Секретарь И. В. Яковлева

ФИЦ Биотехнологии РАН

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 123–133

УДК 635.075:577.114

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ПОСЛЕУБОРОЧНОЙ ОБРАБОТКИ ТОМАТОВ

© 2024 г. А. В. Ильина[1], Б. Ц. Шагдарова[1, *], А. А. Зубарева[1], В. П. Варламов[1]

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

**e-mail: shagdarova.bal@gmail.com*

Поступила в редакцию 15.09.2023 г.
После доработки 18.10.2023 г.
Принята к печати 07.11.2023 г.

Обзорная статья включает информацию об использовании покрытий как из самого хитозана, так и в сочетании с другими полисахаридами и функциональными соединениями, для послеуборочной обработки, главным образом томатов, с целью продления срока хранения собранной продукции. При сборе урожая фруктов и овощей потери от грибковой инфекции могут достигать 50%. Для предотвращения потерь урожая и сохранения качества плодов применяют различные способы послеуборочной обработки. В настоящее время наиболее эффективными средствами, используемыми для борьбы с послеуборочными болезнями, являются синтетические фунгициды, но их не контролируемое применение отрицательно воздействуют на здоровье человека и окружающую среду. В последнее время сохраняется тенденция к расширению использования природных противомикробных препаратов. Такими природными соединениями могут быть хитин и хитозан. Они возобновляемы, биоразлагаемы, малотоксичны и безопасны для потребителей и окружающей среды. Способность хитозана к пленкообразованию и его антимикробные и антиоксидантные свойства важны для получения функциональных покрытий для послеуборочной обработки плодов.

Ключевые слова: хитозан, хитозановое покрытие, хитозан-нанооксидное покрытие, хитозан-полисахаридное покрытие, хитозан-активное покрытие, антимикробные свойства, послеуборочная обработка, плоды томата

DOI: 10.31857/S0555109924020019 **EDN:** GBKOOG

По своей природе большинство сезонных плодоовощных культур имеют короткий срок хранения. Одной из причин этого является сохранение дыхательной активности и транспирации у фруктов и овощей даже после сбора урожая, а другая причина заключается в поражении патогенными микроорганизмами. Потери от грибковой инфекции у фруктов и овощей в послеуборочной цепочке могут достигать от 30 до 50%, в некоторых случаях поражение может привести к полной потере собранного урожая. Качество плодов не может быть улучшено после сбора урожая, а может быть только сохранено [1].

Томаты (*Solanum lycopersicum*) — одна из наиболее экономически важных культур в мире, объем производства которых в 2020 г. составил ~187 млн т, собранных с площади 6.1 млн га [2]. Более 200 видов заболеваний могут привести к значительным потерям во время выращивания и после сбора урожая томатов [3]. Среди фитопатогенных грибов, поражающих посевы томатов, поражение *Botrytis cinerea* является второй по распространенности причиной экономических потерь во всем мире. Относительно короткий срок хранения томатов ограничивает коммерческую транспортировку на большие расстояния и доступность этой продукции круглый год без дополнительной обработки. До 30% собранного урожая томатов может быть утрачено в послеуборочное время, главным образом, в результате поражения, вызванного фитопатогенами, чаще других *B. cinerea* [3–5] и др. Применяемые в настоящее время синтетические фунгициды наиболее эффективны в борьбе с послеуборочными болезнями. Развитие устойчивости у патогенов к синтетическим фунгицидам и негативное воздействие последних на окружающую среду способствует расширению использования природных противомикробных препаратов [8–12].

Хитин и хитозан — это доступные, возобновляемые природные соединения, которые поддаются биологическому разложению, малотоксичны и поэтому безопасны для потребителей и окружающей среды. Хитин и хитозан являются сополимерами N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина, соотношение мономеров в полимерной цепи определяет физические, химические и биологические

свойства. Звенья N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина в хитине и хитозане связаны друг с другом β-1,4-гликозиднымим связями. Хитин отличается от хитозана более высокой долей N-ацетил-D-глюкозамина по сравнению с D-глюкозамином в полимерной цепи [13]. В сельском хозяйстве хитозан используется в основном в качестве экологически безопасного биопестицида, повышающего врожденную способность растений противостоять грибковой инфекции, а также в качестве натурального средства для предотвращения болезней семян и усиления роста растений. Биологическая активность хитозана обусловлена его антимикробными, адсорбционными, антиоксидантными и элиситорными свойствами [12, 14, 15]. Хитин — один из наиболее распространенных полисахаридов в природе среди многих сырьевых материалов. Хитозан — дезацетилированное производное хитина. Способность хитозана к пленкообразованию и его антимикробные и антиоксидантные свойства важны для получения функциональных пленок.

Хитозан не растворяется в воде и в большинстве обычных органических растворителей, но хорошо растворяется в кислых водных растворах с pH ниже 6.3. Растворимость хитозана зависит от его физико-химических характеристик, а также распределения ацетильных групп по основной цепи. В зависимости от используемой для растворения кислоты и концентрации хитозана полимер образует вязкие растворы и проявляет пленкообразующие свойства [16]. Растворение хитозана в кислых условиях способствует активированию его противомикробного действия. В работе [16] исследовали способность различных кислот растворять хитозан из панцирей крабов в виде мелкого порошка и оценивали эффективность растворов биополимера в борьбе с послеуборочной серой гнилью *B. cinerea* на примере ягод столового винограда. Растворение хитозана исследовали в различных органических и неорганических кислотах, взятых в концентрации 1%. Кислоты, которые успешно растворяли хитозан в этой концентрации, имели pH от 0.6 (хлористоводородная) до 2.8 (уксусная), в то время как кислоты (галловая, *транс*-коричная, DL-α-аминомасляная), не способные растворять биополимер, имели pH ⩾ 2.9. Авторы сделали вывод, что физические свойства, такие как вязкость пленкообразующего раствора в диапазоне от 1.9 сП (аскорбат) до 306.4 сП (малеат), а также толщина хитозанового покрытия от 6.5 мкм (ацетат) до 15.4 мкм (аскорбат), не коррелировали с эффективностью его использования. Наиболее эффективной (70%) оказалась обработка раствором ацетата хитозана (вязкость 43.5 сП, толщина покрытия 6.5 мкм) по отношению к патогену, а также при последующем хранении ягод при 15°C в течение 10 дней. Сами растворы кислот с pH 5.6 были не эффективны против патогена.

Антимикробное действие хитозана на патогенные микроорганизмы зависит от штамма, молекулярной массы (ММ), степени дезацетилирования (СД) и других показателей [17]. Высокомолекулярный хитозан может образовывать плотный слой на поверхности микробной клетки, изменяя клеточную проницаемость, таким образом блокируя поступление питательных веществ в клетку. В то время как низкомолекулярный хитозан может проникать в цитозоль и связываться с ДНК клеток, следствием чего является нарушение синтеза мРНК и белка и в результате гибель клетки. Антимикробное действие хитозана заключается во взаимодействии отрицательно заряженных функциональных групп на внешней поверхности мембран микробных клеток с положительно заряженными аминогруппами на хитозане. Это меняет свойства мембраны и может приводить к утечке внутриклеточного содержимого и в конечном итоге к гибели клеток. Электростатическое взаимодействие зависит от состава плазматической мембраны, оно более сильное с мембранами, которые содержат полиненасыщенные жирные кислоты [18]. Кроме того, действие хитозана можно объяснить его хелатирующими свойствами. Хитозан оказывает хелатирующее действие, связывая основные металлы и тем самым подавляя рост микробов. Взаимодействуя с ионами металлов, он ингибирует активный центр метаболических ферментов микробных клеток [19].

Антиоксидантное действие хитозана подразумевает создание барьера для предотвращения образования активных форм кислорода или их доступа к объекту. На сегодняшний день точный механизм удаления свободных радикалов хитозаном не ясен. Возможно, нестационарные свободные радикалы реагируют с функциональными группами в положении C-2, C-3 и C-6 пиранозного кольца с получением стабильных макромолекулярных радикалов [15, 20].

Функциональные покрытия из природного сырья. Количество публикаций, индексируемых в базе данных “Scopus”, связанных с использованием хитозана в качестве материала для покрытия пищевой продукции увеличилось с 30 до 900 в период с 2005 по 2020 г. [21].

В таблице 1 представлены работы, в которых формировали покрытия на основе хитозана в сочетании с другими полисахаридами и функциональными соединениями для послеуборочной обработки продукции с целью продления срока хранения и сохранения качества, главным образом томатов. Покрытия создают барьер для газообмена, снижают дыхание плодов, а также замедляют их созревание.

Покрытия на основе хитозана. Для сохранения собранной продукции ее поверхность может быть покрыта съедобными биоразлагаемыми материалами путем распыления, погружения (рис. 1) или смазывания [32].

Таблица 1. Эффект послеуборочных покрытий из хитозана в сочетании с другими функциональными соединениями на плоды томатов

Томаты, сорт	Характеристики хитозана	Комбинация	Действие	Ссылка
Lycopersicon esculentum Mill	Вязкость 15 сП, СД 90%	Хитозан 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 и 1.0%	Ингибирование *B. cinerea* и *Penicíllium expansum,* увеличение активности полифенолоксидазы, пероксидазы и содержания фенольных соединений при использовании покрытий 0.5 и 1.0%	[22]
Lycopersicon esculentum Mill	ММ 50–190 кДа, вязкость 20–300 сП, СД 75–85%	Хитозан 0.5, 1.0 и 2.0%	Сохранение веса, плотности плодов, содержания ликопина, аскорбиновой кислоты, фенолов и др. 20 сут при 5°С; 10 сут при 21°С при использовании покрытий 0.5 и 1.0%	[23]
Solanum lycopersicum (черри)	–	Хитозан 1% / 0.2, 0.4, 0.6% нано-ZnO, 50 ± 10 нм	Усиление механических, антибактериальных свойств, увеличение зоны ингибирования *Salmonella, E. coli, Alicyclobacillus acidoterrestris* и *Staphylococcus aureus* при использовании покрытия с 0.6% нано-ZnO	[24]
Зеленые *Solanum lycopersicum* L.	ММ 100 кДа, СД 85%	Хитозан 1%/нано-TiO_2, 21 нм, (вес./вес.)	Усиление механических и барьерных свойств, сохранение качества и увеличение срока хранения томатов	[25]
Зеленые *Solanum lycopersicum* L. cv. Zheza 205	СД ⩾ 95%	Хитозан/ нано SiO_x, 20–50 нм	Замедление потери веса, общего количества растворимых твердых веществ, сохранение титруемых кислот, увеличение срока хранения томатов. Уровень ингибирования композитным раствором против *E. coli* и *S. aureus* составлял 43 и 38%	[26]
Solanum lycopersicum L.	СД 83.2%	Хитозан 1.5% / цеолит 3% (вес./вес.)	Потеря веса — 5.6% при использовании покрытия из композита, 8.5% из хитозана. Поражение грибами не наблюдалось 37 сут при 10°С	[27]
–	ММ 160 кДа, СД 94%	15% хитозан бигуанидин гидрохлорид/ КМ-целлюлоза / альгинат	Антибактериальное действие по отношению к *S. pneumonia, Bacillus subtilis* и *E. coli*. Значительное снижение потери веса, замедление порчи фруктов	[28]
Черри (*Koko*)	ММ 190–310 кДа, СД 75–85%	1% хитозан/ экстракт семян грейпфрут (ЭСГ) 0.5–1.2%	Эффективное подавление роста *Salmonella* и мезофильных аэробов, не влияло на концентрацию ликопина, цвет, органолептические свойства, отсутствие потери веса после 21сут/25°С при использовании 1% хитозан/ ЭСГ 1.0%	[29]
Розовые	СД 85%	Хитозан 0.5–1.5% / ванилин 10 и 15 мМ	Снижение изменений твердости, концентрации растворимых сухих веществ плодов, заболеваемости на 74%, тяжести заболеваемости на 79%, потери веса до 90%. Сохранение содержания аскорбиновой кислоты, антиоксидантных свойств. Продление срока хранения до 25 сут при 26 ± 2°С и относительной влажности 60 ± 5% при использовании покрытия хитозан 1.5% / 15 мМ ванилин	[30]
“Chonto” *Solanum lycopersicum* L.	ММ 190–310 кДа, СД 85%	2% хитозан /ЭМР 0.5, 1.0 и 1.5% (об./об.)	Полное подавление роста плесени и дрожжей на поверхности томатов, отсутствие влияния на качество плодов (12 сут, 4 ± 0.2°С) при использовании 2% хитозан / ЭМР 1.0 и 1.5%	[5]
Italian *Lycopersicon esculentum* Mill.	СД 85.9%	16 вариантов: 10 г/л крахмала, маниоки и хитозана (5–30 г/л), эфирное масло (0–10 мл/л) и экстракт кожуры граната (0–20 мл/л)	Наименьшая потеря веса, снижение общего содержания сухих растворимых веществ, сохранение твердости по сравнению с плодами без покрытия при хранении 12 сут при 25°С, при использовании покрытия состоящего из 10 г/л хитозана, 10 г/л крахмала маниоки, 10 мл/л эфирного масла и 20 мл/л экстракта кожуры граната	[31]

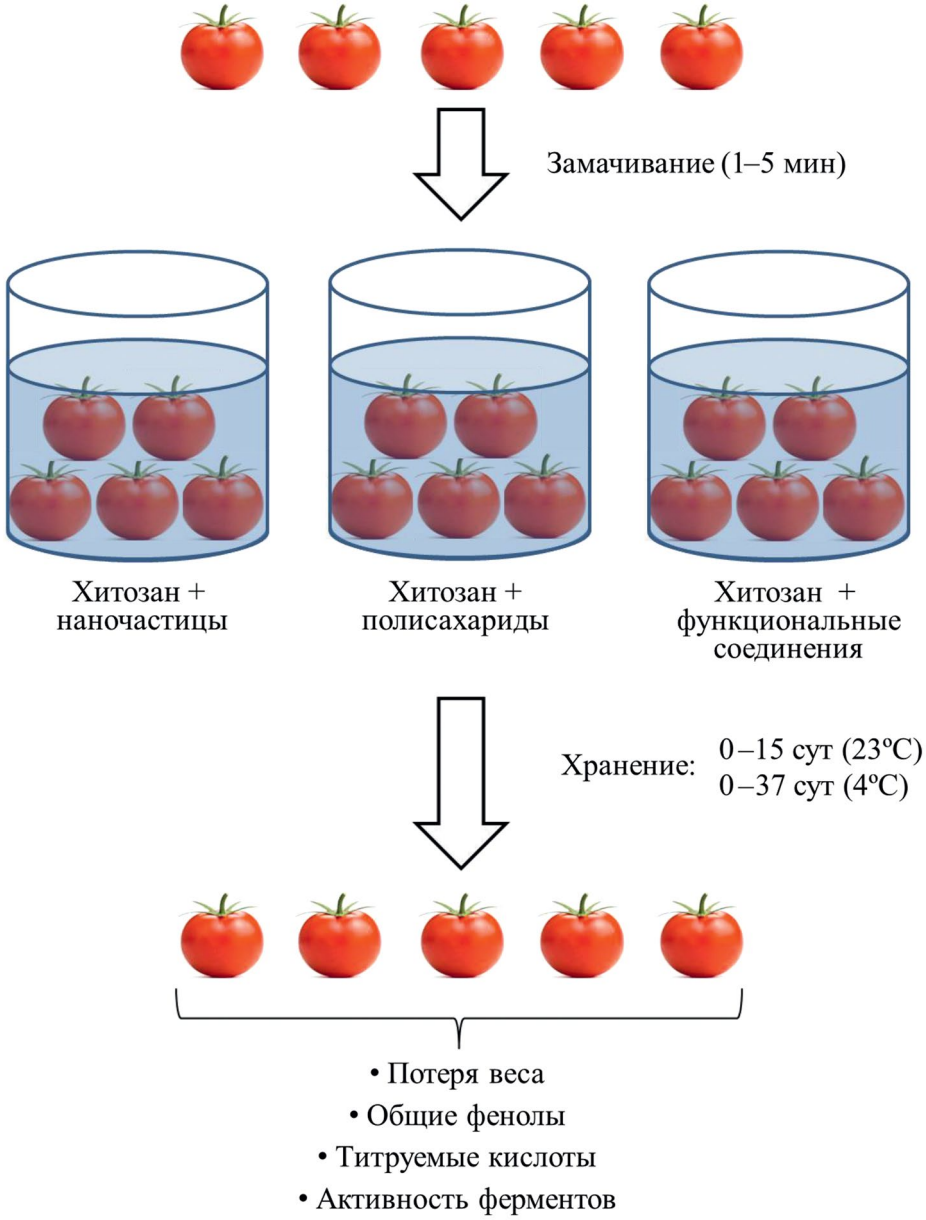

Рис. 1. Влияние покрытий на основе хитозана на сохранность и качество плодов томатов.

В работе [22] было исследовано влияние хитозана на серую и синюю плесени, вызываемые *B.cinerea* и *Penicillium expansum* соответственно на плодах томата (*Lycopersicon esculentum* Mill). Плоды собирали на зрелой стадии (цвет плода красный). Хитозан с СД 90% и вязкостью 15 сП обеспечивал эффективную борьбу с обеими болезнями плодов томатов, хранящихся при 25 и 2°C. В работе использовали 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 и 1.0%-ный солянокислый раствор хитозана (pH 5.4). Хитозан уже значительно ингибировал прорастание спор *P. expansum* и *B. cinerea* при концентрации хитозана 0.5 и 1.0% соответственно, а также удлинение зародышевых трубок и рост мицелия. Хитозан повреждал плазматические мембраны спор обоих патогенов. Плазматическая мембрана *P. expansum* была более чувствительна к хитозану по сравнению с *B. cinerea*. Мембраны *P. expansum* сохраняли целостность на 48.2%, тогда как *B. cinerea* — на 82.5% после 2 ч инкубации на картофельно-декстрозном бульоне, содержащем 0.5% хитозана. Обработка хитозаном вызывала значительное повышение активности ферментов, таких как полифенолоксидазы, пероксидазы, и повышала содержание фенольных соединений в плодах томата. Полученные результаты свидетельствовали о действии хитозана на

серую и синюю гниль плодов, которое могло быть связано с прямым фунгицидным эффектом против патогенов и с проявлением биохимических защитных реакций у плодов.

В работе [23] сообщалось об эффективности применения покрытия на основе хитозана с ММ 50–190 кДа, вязкостью 20–300 сП, СД 75–85%. С целью продления послеуборочного качества свежих томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 'Diamentino') использовали растворы хитозана концентрацией 0.5, 1.0 и 2.0% в уксусной кислоте. Плоды обрабатывали методом погружения в хитозан различной концентрации на 5 мин, тогда как контрольные плоды погружали на такое же время в дистиллированную воду, содержащую уксусную кислоту. После обработки плоды сушили в течение 2 ч при комнатной температуре. Плоды хранили при температуре 5 и 21°C при влажности 90 и 65% соответственно. После обработки 1%-ным раствором хитозана потеря веса плодов уменьшалась относительно контроля в 2 раза к концу срока хранения при 5 и 21°C. Хитозановое покрытие (0.5 и 1%) поддерживало послеуборочное содержание ликопина в плодах. Общее содержание ликопина в томатах, хранившихся при 21°C, было заметно выше, чем в томатах, хранившихся при 5°C. Содержание аскорбиновой кислоты в томатах, обработанных 1%-ным раствором хитозана, на 10 сутки при 21°C составило 9.27 мг/100 г, в контрольных — 7.59 мг/100 г. Авторы рекомендовали использование 1%-ного раствора хитозана в качестве покрытия. Большинство параметров, таких как вес, плотность плодов, визуальное сохранение качества, задержка изменений в биохимическом составе соединений (содержание ликопина, аскорбиновой кислоты, фенолов и др.), при этой концентрации в тестируемый период не ухудшались.

Опираясь на данные, представленные в работе [33] подсчитали, что эффективность борьбы с послеуборочной гнилью на свежих овощах и фруктах с применением хитозана на 35–45% обусловлена его антимикробными свойствами, на 30–40% элиситорными и на 20–30% пленкообразующими. Покрытие из хитозана создает барьер для газообмена, снижения дыхания и замедления созревания. Свойства покрытия, например его вязкость, толщина, зависят от кислоты, в которой растворяли хитозан. Например, вязкость пленкообразующего раствора хитозана в растворе 1%-ной уксусной, муравьиной, молочной или соляной кислоты составляла 43.5, 234.9, 102.9 или 3.9 сП, а толщина покрытия 6.5, 9.8, 9.7 или 11.2 мкм соответственно [16]. Покрытие из хитозана (из панциря краба), растворенного в любой из кислот, уменьшало послеуборочную серую гниль (*B. cinerea*) на примере столового винограда Crimson Seedless. Авторы считают, что наиболее эффективным покрытием является ацетат хитозана (вязкость 43.5 сП), обработка которым эффективно уменьшала послеуборочную гниль и не повреждала ягоды винограда. Небольшие грозди винограда хранили при 0.5 ± 1°C в течение 60 сут.

В работе [34] исследовали влияние хитозанового покрытия на примере плодов гуавы. После сбора урожая плоды имеют короткий срок хранения из-за интенсивных метаболических процессов. В работе для покрытия плодов использовали 1, 2 и 3%-ный раствор хитозана (вязкость 20–300 сП, СД 95–98%). Обработка вызывала значительное снижение активности фенилаланин-аммиак-лиазы и повышение активности пероксидазы. Полученные результаты показали, что покрытие из хитозана эффективно сохраняло качественные характеристики плодов после сбора урожая за счет усиления антиоксидантных процессов, оно задерживало созревание при 25°C в течение 96 ч хранения. Хитозановое покрытие замедляло потерю веса плодов по сравнению с контролем. Увеличение концентрации раствора хитозана с 1.0 до 3.0% давало дополнительное преимущество при контроле потери веса. Этот эффект наблюдался в течение 96 ч после обработки, при этом самые низкие значения наблюдались при обработке 3%-ным раствором хитозана, затем следовали результаты для 2%, 1%-ного покрытия и контрольного образца без покрытия, что свидетельствовало о положительном эффекте хитозанового покрытия в качестве защитного барьера, предотвращающего потерю влаги плодами при транспирации. Авторы полагают, что хитозановое покрытие можно рассматривать для коммерческого применения и увеличения срока годности и сохранения качества плодов при комнатной температуре [34].

Покрытия на основе хитозана с наночастицами неорганических оксидов. Некоторые исследователи считают, что слабая механическая прочность ограничивает применение хитозановых пленок в качестве покрытия. Добавление в хитозановые пленки наночастиц, например оксидов некоторых металлов, улучшает их механические свойства. В работе [24] были разработаны и получены композитные пленки для более длительного хранения плодов томата черри (*Solanum lycopersicum)*. Методом погружения плодов в раствор были получены композитные пленки на основе порошка хитозана с введением 0.2, 0.4 и 0.6% нанооксида цинка (нано-ZnO), с размером частиц 50 ± 10 нм и чистотой 99.8%. Добавление нано-ZnO в хитозановые пленки усиливало их механические, антибактериальные и антиоксидантные свойства. Исследовали противомикробное действие полученных пленок против грамотрицательных бактерий *Salmonella* (ATCC13076) и *Escherichia coli* (ATCC25922), а также грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus (*ATCC25923) и *Alicyclobacillus acidoterrestris* (DSM 3923). На основе механических, оптических,

водорастворимых и антибактериальных свойств композитных пленок была выбрана пленка с содержанием 0.6% нано-ZnO. Добавление наночастиц оксида цинка значительно увеличило зоны ингибирования *Salmonella, E. coli, A. acidoterrestris* и *S. aureus* до 23.30 ± 1.06, 16.36 ± 1.26, 52.25 ± 3.35 и 11.62 ± 0.54 мм соответственно. Антибактериальный эффект композитной пленки был значительно выше в отношении *A. acidoterrestris,* чем против *Salmonella* и *E. coli*. Результаты показали, что композитная пленка, нанесенная на поверхность томатов черри, ограничивала газообмен, замедляла интенсивность дыхания, поддерживала содержание растворимых твердых веществ, цвет и подавляла рост микроорганизмов на поверхности плодов. Каждую группу плодов хранили при температуре 20 ± 5°C и относительной влажности 70–75% в течение 15 сут. Физико-химические свойства томатов черри оценивали при хранении каждые три дня. Авторы считают, что композитная пленка хитозан-нано-ZnO представляет собой материал, который можно применять для решения проблем хранения, связанных с томатами черри [24].

В работе [25] исследовали возможность использования активной упаковки из хитозана (ММ 100 кДа, СД 85%) и хитозана, содержащего наноразмерный диоксид титана (21 нм, чистота 99.5%), для плодов томата (*Solanum lycopersicum* L.). Диоксид титана (TiO_2) проявлял противомикробные свойства, кроме того это широко используемый химически инертный материал [35]. Нанокомпозитная пленка хитозан/TiO_2 и пленка из хитозана были изготовлены методом литья из раствора с последующим выдерживанием при 25°C, влажности 50% в течение 48 ч. Полученные пленки использовали в качестве активной упаковки для замедления процесса созревания томатов черри (*Solanum Lycopersicum* L.). У плодов ряда растений, и в том числе томатов, наблюдается резкий подъем дыхания в конце их созревания, контролируемый этиленом. Пленка из хитозана с наночастицами TiO_2 (1%, вес/вес) имела хорошие механические и барьерные свойства и обладала способностью к фоторазложению этилена. Были определены изменения плотности плодов, потеря веса, цвета, содержание ликопина, общего растворимого сухого вещества, аскорбиновой кислоты и концентрации этилена и углекислого газа в томатах, упакованных в пленку хитозан/TiO_2 и пленку только из хитозана, во время хранения при 20°C. Авторы полагают, что разработанная нанокомпозитная пленка хитозан/TiO_2 может быть использована для коммерческого применения при послеуборочной обработке свежих продуктов.

В работе [26] была изучена эффективность композитной пленки на основе хитозана (СД ⩾ 95%) и нанокремния (нано-SiO_x) со средним размером частиц 20–50 нм. Оксид кремния (SiO_x) благодаря своей полигидроксильной структуре легко связывается с поверхностью хитозана, тем самым повышая механические свойства хитозанового покрытия. Для приготовления пленкообразующего раствора использовали 1%-ный раствор хитозана в 0.1%-ной уксусной кислоте. Весовое соотношение хитозана к частицам нано-SiO_x составляло 20 : 1. Для лучшего растворения обоих компонентов использовали ультразвуковую обработку. Композитные пленки были использованы для проверки их профилактического действия на томатах в условиях хранения в течение 15 сут при влажности 85%, 23 ± 1°C. Исследования проводили на томатах (*Solanum lycopersicum* L. cv. Zheza 205) зеленой спелости, чтобы уменьшить послеуборочные потери. Плоды обрабатывали пленкообразующими растворами методом погружения. Антибактериальную активность пленкообразующих растворов анализировали относительно типичных патогенных микробов пищевого происхождения, *E. coli,* CICC23657 и *S. aureus,* CICC10384. Уровень ингибирования раствором композита хитозан/нано-SiO_x против *E. coli и S. aureus* составлял 42.88 и 37.85% соответственно, а для раствора хитозана — 30.00 и 19.45% соответственно. Было показано, что формирование полупроницаемого композитного покрытия успешно поддерживало качество томатов за счет замедления потери влаги, газообмена и дыхания. Результаты показали, что пленка хитозан/нано-SiO_x замедляла потерю веса, общих растворимых сухих веществ, сохраняла титруемые кислоты и заметно продлевала срок хранения томатов.

В работе [27] оценили влияние хитозановых покрытий в сочетании с цеолитом на показатели качества при хранении томатов (*Lycopersicon esculentum* сорт FA-180 HAZERA) в холодильнике [27]. Покрытия наносили двукратным погружением плодов на 5 мин в пленкообразующие растворы, содержащие только хитозан (СД 83.2%), хитозан и Твин-80 (0.1%, мас./об.), хитозан и цеолит (3%, вес/вес). Плоды после покрытия высушивали в течение 1 ч при 25°C и далее хранили при 10°C в течение 37 сут. В покрытиях использовали хитозан в концентрации 1.5%, в качестве растворителя — 1%-ную молочную кислоту. Добавление цеолита и Твин-80 в раствор хитозана улучшало его обволакивающие свойства и задерживало созревание томатов. Никаких признаков грибкового поражения плодов без покрытия и с покрытием не наблюдали в период хранения при 10°C в течение 37 сут. Эффективность обработок для продления срока хранения плодов оценивали путем определения интенсивности дыхания, качественных характеристик и общего внешнего вида. Покрытия хитозана с цеолитом и хитозана с Твин-80 не представляли собой эффективного барьера, предотвращающего потерю веса в конце срока хранения, которая

составила 5.59 и 5.74%, а для покрытия только из хитозана — 8.45% [27].

Покрытия из хитозана в сочетании с другими полисахаридами. Покрытия на основе полисахаридов обладают прекрасной способностью образовывать полупроницаемые пленки на свежих фруктах. Комбинирование двух и более полимеров — самый простой способ получения полисахаридных пленок с лучшими функциональными свойствами [36].

Исследователи в работе [37] получали методом литья функциональные пленки из смеси биополимеров альгината натрия и карбоксиметилцеллюлозы (**КМЦ**) с добавлением различных концентраций картофельного крахмала. С помощью ИК-Фурье-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа, сканирующей электронной микроскопии и термогравиметрии были исследованы химические, морфологические и термические характеристики полученных пленок. Физические, оптические, влагостойкие, механические и барьерные свойства анализировали в зависимости от концентраций альгинат/КМЦ и крахмала. Повышенная концентрация крахмала (50%) способствовала улучшению защиты от УФ-излучения, кислорода и водяного пара, а также уменьшению содержания влаги и увеличению длины пленки. Пленки с содержанием крахмала 50% имели равномерную толщину, повышенную термостойкость и высокую прочность на разрыв. Было показано, что пленка способна увеличить срок годности плодов винограда после сбора урожая до 16 сут, что подтвердило перспективу использование таких пленок.

В работе [28] авторы получили и исследовали пищевое покрытие на основе КМЦ с ММ 90 кДа (числовая) и степенью замещения (**СЗ**) 0.75 альгината (**А**) и производного гидрохлорида хитозана с бигуанидином (**ГБХ**). Для синтеза производного использовали хитозан с ММ 160 кДа (вязкостная), СД 94%. Полученное производное было использовано в качестве сшивающего агента в концентрации 5, 10 и 15% при формировании пленок. Методом ИК-Фурье-спектроскопии подтвердили получение пленок, в составе которых присутствовали три полисахарида. Широкоугольная дифракция рентгеновских лучей показала, что аморфная структура КМЦ/А приобретала некоторую степень упорядоченности после добавления ГБХ. По результатам термографического анализа добавление ГБХ значительно улучшило тепловые свойства пленок и не изменило прозрачность пленок КМЦ/А. Механические и антибактериальные свойства относительно *Streptococcus pneumonia* (RCMB010010), *Bacillus subtilis* (RCMB010067) и *E. coli* (RCMB010052) были значительно улучшены после добавления производного хитозана в тестируемых концентрациях в пленкообразующий раствор, которым покрывали плоды томатов методом погружения (несколько раз). В качестве примера был выбран пленкообразующий раствор с КМЦ/А/15%ГБХ благодаря превосходным антибактериальным свойствам. Зоны ингибирования бактерий *S. pneumonia, B. subtilis и E. coli* составляли 15.68, 14.48 и 11.56 мм соответственно, при использовании ампициллина — 23.80 и 32.40 мм относительно *S. pneumonia* и *B. subtilis.* Томаты с покрытием продемонстрировали значительно меньшую потерю веса (приблизительно в 5 раз) по сравнению с контролем в конце срока хранения (на 20 сут), и порча плодов после нанесения покрытия замедлялась. По мнению авторов, этот результат может быть связан с повышением барьерных свойств покрытия благодаря увеличению степени сшивки производным хитозана.

В работе [38] получали и исследовали пленки на основе пектина (ММ 111.1 кДа, степень этерификации 48.36%) и хитозана (ММ 70 кДа, СД 90%) в форме наносуспензии, полученной методом полимеризации раствора хитозана (0.8%) в метакриловой кислоте (0.5%), в соотношении пектин : нанохитозан: 100 : 0; 75 : 25; 50 : 50; 25 : 75 и 0 : 100 (масс.%). Пленкообразующие суспензии пектин : нанохитозан ингибировали рост *Colletotrichum gloeosporioides, Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger и E. coli*. Оказалось, что пленка, состоящая только из пектина, не оказывала ингибирующего действия на исследуемые микроорганизмы. Антимикробные свойства пленкообразующих растворов улучшались при увеличении содержания наносуспензии хитозана с 25 до 50%. Антимикробная активность наносуспензии хитозана объяснялась особыми размерными характеристиками наночастиц и высоким поверхностным зарядом. Авторы полагали, что причина меньшей ингибирующей способности пленки пектин : нанохитозан (25 : 75) по сравнению с пленкой с соотношением 50 : 50 возможно вызвана агрегацией и неравномерным распределением нанохитозана, что приводило к уменьшению контактов между нанохитозаном и микробной поверхностью. Смешивание пектина с нанохитозаном приводило к улучшению механических, барьерных и гидрофильных свойств. На хорошее взаимодействие пленкообразующих компонентов для пленок пектин : нанохитозан в соотношении (50 : 50) указывали спектры ИК-спектроскопии с нарушенным полным внутренним отражением и изображения сканирующей электронной микроскопии. Авторы считают, что получение пленки пектин : нанохитозан — это новый подход к разработке активной упаковки для продления срока годности пищевых продуктов [38].

Покрытия из хитозана в сочетании с другими функциональными соединениями. Добавление фенольных соединений, эфирных масел и экстрактов фруктов в пленки на основе полисахаридов существенно повышает их антиоксидантные и антимикробные свойства, способствует продлению срока

годности и сохранению качества продукции [39]. На антиоксидантную активность покрытий сильное влияние может оказывать эффект взаимодействия между различными компонентами.

Было разработано покрытие на основе хитозана (ММ 190–310 кДа, СД 75–85%) и экстракта семян грейпфрута (**ЭСГ**) [29]. Известно, что ЭСГ является функциональным материалом, содержащим различные биологически активные компоненты, такие как флавоноиды, полифенолы, органические кислоты и другие, которые, как считается, отвечают за противомикробную и антиоксидантную активность. Томаты черри (*Koko*) после сбора урожая покрывали пленкой погружением в 1%-ный коллоидный раствор хитозана, который содержал Твин-20 (в количестве 25% от массы ЭСГ). Исследовалось присутствие ЭСГ в концентрации 0.5, 0.7, 1.0 и 1.2% в коллоидном растворе хитозана. Покрытия с ЭСГ (1.0%) эффективно ингибировали рост сальмонелл в присутствии трех штаммов *Salmonella typhimurium* (*CCARM 8164*), *Salmonella enteritidis* (*CCARM 8040*) *и Salmonella montevideo* (*CCARM 8052*), снижали образование CO_2 и замедляли снижение титруемой кислотности в условиях хранения при 10 и 25°C. При включении ЭСГ в состав пленок была продемонстрирована задержка роста микроорганизмов со снижением потери веса при 25°C. Покрытие хитозан-ЭСГ не влияло на концентрацию ликопина, цвет и органолептические свойства плодов. Результаты, полученные в этом исследовании, показали, что использование коллоидного покрытия хитозан-ЭСГ может быть эффективной послеуборочной технологией защиты плодов томатов черри от сальмонеллы и поддержания их качества [40].

В работе [30] были получены покрытия на основе хитозана (СД 85%) и ванилина — фенольного альдегида, обладающего антимикробными свойствами. Водные растворы ванилина смешивали с тремя растворами хитозана разной концентрации с образованием покрытий: 0.5% хитозан + 10 мМ ванилин; 1.0% хитозан + 10 мМ ванилин; 1.5% хитозан + 10 мМ и 0.5% хитозан + 15 мМ ванилин; 1.0% хитозан + 15 мМ ванилин; 1.5% хитозан + 15 мМ ванилин. Все покрытия содержали 0.1% Твин-20. Авторы тестировали физико-химические качества плодов томатов в период хранения при 26±2 °C и относительной влажности 60±5% с интервалом в 5 сут. Результаты показали, что покрытие 1.5% хитозана + 15 мМ ванилина способствует снижению заболеваемости плодов на 74.16% и тяжести заболевания на 79%, задержке в потери веса до 90% и уменьшению изменений твердости плодов, а также концентрации растворимых твердых веществ и цветности. Покрытие также снижало интенсивность дыхания и скорость образования этилена по сравнению с контролем и томатами, обработанными 0.5% хитозаном + 10 мМ ванилина. Кроме того, содержание аскорбиновой кислоты и антиоксидантные свойства томатов были сохранены, а срок хранения продлен до 25 сут.

Эфирные масла лимона, апельсина, мандарина, гвоздики, эвкалипта, мяты — это ароматические маслянистые вещества, обладающие антимикробными и антиоксидантными свойствами [41]. В сочетании с хитозаном эфирные масла оказывают хорошее защитное действие на послеуборочной стадии хранения овощей и фруктов, сводя к минимуму дыхание плодов и уменьшая скорость потери воды.

В работе [5] использовали хитозан с ММ 190–310 кДа и СД 85% в сочетании с эфирным маслом руты (*Ruta graveolens*) для послеуборочной обработки томатов сорта “Chonto” (*Solanum lycopersicum* L.) методом погружения. Полученные результаты оценивали в течение 12 сут в условиях охлаждения (4 ± 0.2°C). Для получения пленкообразующей суспензии хитозан растворяли в 0.1 М уксусной кислоте, получали 2%-ный раствор (масса/об.) и добавляли глицерин (2.5% об./об.), Твин-80 (1% об./об.) и эфирное масло (0.5, 1.0 и 1.5% об./об. по отношению к раствору хитозана). Было исследовано влияние таких покрытий хитозана в сочетании с эфирным маслом на физико-химические свойства плодов томата на 0, 3, 6, 9 и 12 сут хранения. Авторы отмечали, что противогрибковая активность такого покрытия сильно зависела от содержания эфирного масла. Противогрибковый механизм действия эфирных масел, по мнению авторов, может быть связан с их диффузией внутрь клеток. Было исследовано влияние покрытия из хитозана с разным содержанием эфирного масла на концентрацию аэробных мезофильных бактерий и количество плесеней на томатах. Авторы показали, что покрытие из хитозана с добавлением 1.5% эфирного масла руты обладало барьерным эффектом, предотвращало загнивание плодов, демонстрировало меньшую потерю веса (17%) в конце срока хранения, по сравнению с непокрытыми плодами (30%). Индекс зрелости плодов показал достоверные различия между не покрытыми (12.65%) и покрытыми пленкой плодами из хитозана с содержанием 1% эфирного масла (10.21%) на 12 сут. По мнению авторов, исследованные покрытия могут быть перспективными для послеуборочной обработки томатов “Chonto”.

В работе [31] было изучено влияние пищевого покрытия, состоящего из крахмала маниоки и хитозана с добавлением эфирного масла перца и розмарина *Lippia sidoides* Cham, а также экстракта кожуры граната, на срок годности томатов, которые хранили при температуре 25°C в течение 12 сут. Для исследования получили 16 вариантов покрытий, содержащих крахмал маниоки 10 г/л, хитозан в концентрации 5, 10, 20 и 30 г/л, эфирное масло 0, 2.5, 5 и 10 мл/л и экстракт кожуры граната 0, 5, 10 и 20 мл/л. Плоды погружали в каждый состав,

сушили при комнатной температуре в течение 30 мин. Результаты оценивали на 1, 4, 8 и 12 сут. Томаты, покрытые составом, содержащим 10 г/л крахмала маниоки, 10 г/л хитозана, 10 мл/л эфирного масла и 20 мл/л экстракта кожуры граната продемонстрировали наименьшую потерю веса, снижение общего содержания растворимых веществ, сохраняли постоянную твердость по сравнению с непокрытыми плодами. Такое покрытие имеет потенциал для использования в будущем в качестве биоактивной упаковки. Однако необходимы дальнейшие исследования для оценки органолептических параметров томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill) с предлагаемым покрытием и безопасности потребления их человеком.

В работе [42] был получен композитный материал на основе двух биополимеров: хитозана (ММ 450 кДа, СД 75–85%) и КМЦ (ММ 41 кДа), сшитый глутаровым диальдегидом с добавлением эфирного масла корицы и олеиновой кислоты. Гидрофильные свойства пленок, сформированных только из хитозана и КМЦ, могут ограничивать их использование. Получение пленок на основе этих двух биополимеров с введением глутарового диальдегида уменьшало их гидрофильные свойства и увеличивало гидрофобные. Использование сшивающего агента способствовало формированию плотной структуры пленок с повышенной механической прочностью и пониженной паропроницаемостью. Межмолекулярные взаимодействия в матрице на основе хитозана-КМЦ в присутствии различных добавок были изучены методом ИК-Фурье-спектроскопии. Добавление эфирного масла корицы улучшало антиоксидантные свойства пленок, а введение олеиновой кислоты предотвращало появление влаги. Наибольшая противомикробная активность наблюдалась у композитных пленок с добавлением эфирного масла корицы *in vitro* в отношении *Listeria monocytogenes* и *Pseudomonas aeruginosa*. Гидрофобная природа эфирного масла корицы способствовала более легкому проникновению композитного материала в фосфолипидный бислой бактерий, что приводило к разрушению клеточной стенки и к вытеканию внутриклеточного содержимого. Было отмечено, что олеиновая кислота ослабляла физические и механические свойства пленки из хитозана с КМЦ. Снижение механических свойств, как полагают авторы, связано с образованием пор вдоль поверхности, что указывало на псевдогидрофильный характер покрытий. Композитные пленки, приготовленные в этой работе, за исключением пленки с олеиновой кислотой, являются хорошими кандидатами на продление сроков годности скоропортящихся продуктов.

В работе [43] были разработаны и получены активные пленки на основе хитозана (ММ 50 кДа, СД 90.27%), гуммиарабика из *Acacia senegal* (ММ 300 кДа) — полисахарида, имеющего отличные эмульгирующие свойства, и эфирного масла корицы. Исследовано влияние соотношения обоих разноименно заряженных полимеров на структуру пленки, физические и антиоксидантные свойства. Взаимодействия между полимерами и эфирным маслом корицы оценивали с помощью реологических исследований, ИК-Фурье-спектроскопии и метода рентгеновского дифракционного анализа. Результаты показали, что существуют электростатические взаимодействия между хитозаном и гуммиарабиком, которые приводят к образованию сложной структуры. Усиление антиоксидантной способности пленки наблюдали при изменении соотношения хитозан/гуммиарабик от 1 : 0 до 1 : 2, а при содержании компонентов 1 : 4 она быстро снижалась, что могло быть связано, как полагают авторы, с негативным влиянием взаимодействий между хитозаном и гуммиарабиком, которое приводило к потере основного антиоксиданта — эфирного масла корицы. Авторы статьи считают, что необходимо изучение биохимических и физиологических реакций при взаимодействии свежих продуктов с полученными пленками.

По результатам исследований ряда авторов использование покрытий для свежих фруктов и овощей на основе хитозана, а также в сочетании с полисахаридами и другими функциональными соединениями технологически оправдано и имеет преимущества, обусловленные их природным происхождением, доступностью сырья, биологическим разложением, малой токсичностью и безопасностью для потребителей и окружающей среды.

Для улучшения свойств покрытий и продления срока хранения продукции в хитозановые пленки добавляли наночастицы оксидов металлов. Комбинирование хитозана с другими полисахаридами, фенольными соединениями, эфирными маслами и экстрактами фруктов способствовало усилению антиоксидантных, антимикробных свойств композитных пленок.

Авторы в своих исследованиях для формирования покрытий из пленкообразующих растворов в основном использовали хитозан ракообразных в концентрации 1% в 1%-ной уксусной кислоте со средней ММ, в некоторых работах использовали хитозан с низкой ММ и преимущественно со степенью дезацетилирования 75–85%. Обработку плодов томата чаще осуществляли методом погружения в пленкообразующий раствор на несколько минут в обычных условиях.

Для улучшения свойств покрытий и продления срока хранения продукции в хитозановые пленки добавляли наночастицы оксидов, эфирные масла, производные фенола [23, 29, 30].

Следует отметить, что большинство покрытий преимущественно снижали потерю веса у плодов томата по сравнению с непокрытыми плодами. Так,

в результате использования 1%-ного раствора хитозана с ММ 50–190 кДа и СД 75–85% потеря веса к концу срока хранения при 21°С и влажности 65% была в 2 раза меньше. При использовании хитозана ММ 190–310 кДа, СД 75–85% с добавлением 1%-ного экстракта семян грейпфрута не отмечали потери веса во время хранении при 25°С в течение 21 сут. При добавлении ванилина (15 мМ) в покрытие из хитозана (1.0–1.5%) отмечали потерю веса на 4.5%, в то время как в необработанных контрольных образцах на 12.6%, в условиях хранения (26 ± 2°С, влажность 60 ± 5%) в течение 25 сут.

Применение большинства хитозановых покрытий в больших масштабах и введение их в послеуборочную коммерческую практику в настоящее время не проводилось. Нужны дальнейшие исследования композитных хитозановых покрытий, содержащих наноматериалы, а также уточнения типов пищевых продуктов, которые могут взаимодействовать с используемыми покрытиями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Данная работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Arah I. K., Amaglo H., Kumah E. K., Ofori H.* // Int. J. Agron. 2015. V. 2015. P. 1–6. https://doi.org/10.1155/2015/478041
2. FAOSTAT, https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize (accessed June 19, 2023).
3. *Panno S., Davino S., Caruso A. G., Bertacca S., Crnogorac A., Mandić A., Noris E., Matić S.* // Agronomy. 2021. V. 11 № 11. P. 2188. https://doi.org/10.3390/agronomy11112188
4. *Hua L., Yong C., Zhanquan Z., Boqiang L., Guozheng Q., Shiping T.* // Food Qual. Saf. 2018. V. 2. № 3. P. 111–119. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016
5. *Peralta-Ruiz Y., Tovar C. D.G., Sinning-Mangonez A., Coronell E. A., Marino M. F., Chaves-Lopez C.* // Polymers. 2020. V. 12. № 8. P. 1822. https://doi.org/10.3390/polym12081822
6. *Rizwana H., Bokahri N. A., Alsahli S. A., Al Showiman A. S., Alzahrani R. M., Aldehaish H. A.* // Saudi J. Biol. Sci. 2021. V. 28. № 4. P. 2236–2244. https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.01.014
7. *Hernández-Lauzardo A.N., Velázquez-del Valle M. G., Veranza-Castelán L., Melo-Giorgana G.E., Guerra-Sánchez M.G.* // Fruits. 2010. V. 65. № 4. P. 245–253. https://doi.org/10.1051/fruits/2010020
8. *Li Z., Jennings A.* // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2017. V. 14. № 7. https://doi.org/10.3390/ijerph14070826.
9. *Bakshi P. S., Selvakumar D., Kadirvelu K., Kumar N. S.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 150. P. 1072–1083. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.10.113
10. *Maliki S., Sharma G., Kumar A., Moral-Zamorano M., Moradi O., Baselga J. et al.* // Polymers. 2022. V. 14. № 7. https://doi.org/10.3390/polym14071475.
11. *Krasnow C., Ziv C.* // Agronomy. 2022. V. 12. № 1. P. 216. https://doi.org/10.3390/agronomy12010216
12. *Chiu T., Poucet T., Li Y.* // Synth. Syst. Biotechnol. 2022. V. 7. № 4. P. 1075–1083. https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2022.06.009
13. *Naveed M., Phil L., Sohail M., Hasnat M., Baig M. M.F.A., Ihsan A. U. et al.* // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 129. P. 827–843. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192
14. *Duan C., Meng X., Meng J., Khan M. I.H., Dai L., Khan A. et al.* // J. Bioresour. Bioprod. 2019. V. 4. № 1. P. 11–21. https://doi.org/10.21967/JBB.V4I1.189
15. *Ngo D.-H., Kim S.-K.* // Adv. Food Nutr. Res. 2014. V. 73. P. 15–31. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0
16. *Romanazzi G., Gabler F. M., Margosan D., Mackey B. E., Smilanick J. L.* // Phytopathology. 2009. V. 99. № 9. P. 1028–1036. https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-9-1028
17. *Ke C.-L., Deng F.-S., Chuang C.-Y., Lin C.-H.* // Polymers. 2021. V. 13. № 6. P. 904. https://doi.org/10.3390/polym13060904
18. *Dutta P. K., Tripathi S., Mehrotra G. K., Dutta J.* // Food Chem. 2009. V. 114. № 4. P. 1173–1182. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.11.047
19. *Kumar S., Mukherjee A., Dutta J.* // Trends Food Sci. Technol. 2020. V. 97. P. 196–209.0 https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.01.002
20. *Priyadarshi R., Sauraj, Kumar B., Deeba F., Kulshreshtha A., Negi Y. S.* // Food Hydrocoll. 2018. V. 85. P. 158–166. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.07.003
21. *Flórez M., Guerra-Rodríguez E., Cazón P., Vázquez M.* // Food Hydrocoll. 2022. V. 124. P. 107328. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.107328
22. *Liu J., Tian S., Meng X., Xu Y.* // Postharvest Biol. Technol. 2007. V. 44. № 3. P. 300–306. https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2006.12.019
23. *Fatma Kibar H., Sabir F. K., Kibar H. F., Sabir F. K.* // AIMS Agric. Food. 2018. V. 3. № 2. P. 97–108. https://doi.org/10.3934/agrfood.2018.2.97
24. *Li Y., Zhou Y., Wang Z., Cai R., Yue T., Cui L.* // Foods. 2021. V. 10. № 12. P. 3135. https://doi.org/10.3390/foods10123135
25. *Kaewklin P., Siripatrawan U., Suwanagul A., Lee Y. S.* // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 112. P. 523–529. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.01.124

26. *Zhu Y., Li D., Belwal T., Li L., Chen H., Xu T., Luo Z.* // Molecules. 2019. V. 24. № 24. P. 4552. https://doi.org/10.3390/molecules24244552
27. *García M., Casariego A., Díaz R., Roblejo L.* // Emirates J. Food Agric. V. 26. № 3. P. 238–246. https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i3.16620
28. *Salama H. E., Abdel Aziz M. S., Alsehli M.* // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 139. P. 614–620. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.08.008
29. *Won J. S., Lee S. J., Park H. H., Bin Song K., Min S. C.* // J. Food Sci. 2018. V. 83. № 1. P. 138–146. https://doi.org/10.1111/1750–3841.14002
30. *Safari Z. S., Ding P., Juju Nakasha J., Yusoff S. F.* // Coatings. 2020. V. 10. № 12. P. 1222. https://doi.org/10.3390/coatings10121222
31. *Araújo J. M.S., de Siqueira A. C.P., Blank A. F., Narain N., de Aquino Santana L. C.L.* // Food. Bioprocess. Technol. 2018. V. 11. 1750–1760. https://doi.org/10.1007/s11947-018-2139-9
32. *Ahmed S., Sameen D. E., Lu R., Li R., Dai J., Qin W., Liu Y.* // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2022. V. 62. № 11. P. 3088–3102. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1863327.
33. *Romanazzi G., Feliziani E., Sivakumar D.* // Front. Microbiol. 2019. V. 9. P. 2745. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02745.
34. *Batista Silva W., Cosme Silva G. M., Santana D. B., Salvador A. R., Medeiros D. B., Belghith I., et al.* // Food Chem. 2018. V. 242. P. 232–238. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.052
35. *Tang Y., Hu X., Zhang X., Guo D., Zhang J., Kong F.* // Carbohydr. Polym. 2016. V. 151. P. 752–759. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.023
36. *Deng J., Zhu E.-Q., Xu G.-F., Naik N., Murugadoss V., Ma M.-G. et al.* // Green Chem. 2022. V. 24. № 2. P. 480–492. https://doi.org/10.1039/D1GC03898B
37. *Ramakrishnan R., Kulandhaivelu S. V., Roy S., Viswanathan V. P.* // Ind. Crops Prod. 2023. V. 193. P. 116114. https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2022.116114
38. *Ngo T. M.P., Nguyen T. H., Dang T. M.Q., Tran T. X., Rachtanapun P.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 6. https://doi.org/10.3390/ijms21062224.
39. *Dutta D., Sit N.* // J. Food Sci. Technol. 2023. V. 60. P. 1888–1902. https://doi.org/10.1007/s13197-022-05474-5
40. *Roy S., Zhang W., Biswas D., Ramakrishnan R., Rhim J.-W.* // Molecules. 2023. V. 28. № 2. P. 730. https://doi.org/10.3390/molecules28020730
41. *Shehata S. A., Abdeldaym E. A., Ali M. R., Mohamed R. M., Bob R. I., Abdelgawad K. F.* // Agronomy. 2020. V. 10. № 10. P. 1466. https://doi.org/10.3390/agronomy10101466
42. *Valizadeh S., Naseri M., Babaei S., Hosseini S. M. H., Imani A.* // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 134. P. 604–612. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.071
43. *Xu T., Gao C., Feng X., Yang Y., Shen X., Tang X.* // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 134. P. 230–236. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.189

Chitosan-based Functional Coatings for Postharvest Processing of Tomatoes

A. V. Il'ina[a], B. Ts. Shagdarova[a, *], A. A. Zubareva[a], and V. P. Varlamov[a]
[a] *Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*
**e-mail: shagdarova.bal@gmail.com*

The review article includes information on the use of coatings, both from chitosan itself and in combination with other polysaccharides and functional compounds, for postharvest processing, mainly of tomatoes, to extend the shelf life of harvested produce. During harvesting of fruits and vegetables, losses due to fungal infection can be as high as 50%. To prevent yield losses and preserve fruit quality, various methods of postharvest treatment are used. Currently, the most effective means used to control postharvest diseases are synthetic fungicides, but their uncontrolled use negatively affects human health and the environment. Recently, there has been a continuing trend to increase the use of natural antimicrobial agents. Such natural compounds can be chitin and chitosan, they are renewable, biodegradable, low toxicity and safe for consumers and the environment. The film-forming ability of chitosan and its antimicrobial, antioxidant properties are important for obtaining functional coatings for postharvest processing of fruits.

Keywords: chitosan, chitosan-nano-oxide coating, chitosan-polysaccharide coating, chitosan-active coating, antimicrobial properties, postharvest processing, tomato fruits

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 134–142

УДК 547.995.12:577.114.7

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТОЗАНА, РАСТВОРИМЫЕ В НЕЙТРАЛЬНЫХ СРЕДАХ — СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

© 2024 г. М. Ю. Горшкова[1], *, Э. С. Григорян[1], И. Ф. Волкова[1]

[1]*Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

**e-mail: mgor@ips.ac.ru*

Поступила в редакцию 08.09.2023 г.
После доработки 03.11.2023 г.
Принята к публикации 06.11.2023 г.

Предложен двухстадийный метод проведения модификации хитозана, обеспечивающий контролируемое присоединение кватернизованного блока. Структура полученных продуктов изучена методами ИК-Фурье- и ЯМР-спектроскопии; растворимость охарактеризована методом турбодиметрии; кислотно-основные свойства определены методом потенциометрии. Показано, что для получения растворимых продуктов необходимо наличие ~50% кватернизованных аминогрупп. Разница в pH-чувствительности модифицированных производных с разным типом присоединения кватернизованного блока выявлена на примере их комплексов с модельным полистиролсульфонатным анионом. Продемонстрирована возможность получения на основе синтезированных производных комплексов с ДНК — полиплексов, размеры которых определялись структурой производных, стабильных в условиях близких к физиологическим. Полученные результаты могут составить основу для разработки систем доставки лекарственных средств и генетического материала.

Ключевые слова: хитозан, растворимые производные хитозана, квартенизованные производные хитозана, системы доставки лекарственных веществ, полиплексы, трансфекция

DOI: 10.31857/S0555109924020028 **EDN:** GBFIMA

Комплекс уникальных свойств хитозана (**ХТЗ**), его биологическая активность, биосовместимость, биодеградируемость, а также низкая токсичность, обусловливают его широкое биомедицинское применение. На основе ХТЗ уже созданы многочисленные продукты разного типа: от покрытий на раны и ожоги до систем доставки лекарственных препаратов [1–5]. В настоящее время задачей является повышение эффективности действия и расширение области применения продуктов на основе ХТЗ за счет придания им чувствительности к действию внешних факторов, создания так называемых «смарт»-систем. Для успешного применения ХТЗ в подобных системах возникает необходимость введения в цепи полисахарида дополнительных функциональных групп, а поскольку необходимым условием использования подобных систем является совместимость с физиологическими средами, для их создания предпочтительны водорастворимые формы ХТЗ, среди которых наиболее перспективным представляется N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний) пропил] ХТЗ хлорид (**N-мХТЗ**). В отличие от кватернизованных производных ХТЗ, полученных прямым метилированием аминогрупп, N-мХТЗ является не только высоко заряженным, но и структурно гомогенным поликатионом, сочетающим биосовместимость, биодеградируемость исходного полисахарида с растворимостью во всем диапазоне pH. Каждое модифицированное звено N-мХТЗ помимо кватернизованной аминогруппы содержит вторичную аминогруппу, заряд которой зависит от кислотности среды. Структура и свойства кватернизованного ХТЗ и закономерности его взаимодействия с синтетическими и нуклеиновыми кислотами изучены в цикле предыдущих работ [6–8]. Были получены комплексы N-мХТЗ с ДНК и малыми интерферирующими РНК (**миРНК**), которые обеспечивали большую эффективность трансфекции в экспериментах *in vitro*, чем известные системы на основе ХТЗ [9]. Однако следует отметить, что наряду со всеми преимуществами N-мХТЗ их получение сопровождается превращением первичных аминогрупп хитозана во вторичные. Между тем первичные аминогруппы необходимы для обеспечения возможности дальнейшей модификации полисахарида и повышения стабильности его комплексов с отрицательно заряженными

соединениями. Кроме того, первичные аминогруппы обусловливают проявление pH-чувствительности поликатиона: в кислых средах количество зарядов на его цепях увеличивается за счет ионизации этих групп. Это обстоятельство может стать решающим для осуществления трансфекции комплексами модифицированного ХТЗ (**мХТЗ**) с нуклеиновыми кислотами, обеспечивая выход нуклеиновой кислоты из эндосом и лизосом по механизму протоновой губки. Известно так же, что первичные аминогруппы играют важную роль в обеспечении антиоксидантной активности ХТЗ [10]. Таким образом, задача получения растворимого во всем диапазоне pH полисахарида с сохранением первичных аминогрупп в его звеньях остается актуальной. Проведение модификации ХТЗ (2,3-эпоксипропил)триметиламмоний хлоридом (глицидилтриметиламмоний хлоридом, (**ГТМАХ**)) по гидроксильным группам полисахарида представляется одним из возможных способов решения задачи. Однако, несмотря на многочисленные попытки, не удалось получить растворимые в нейтральных средах производные ХТЗ. Степень модификации полисахарида при проведении реакции в щелочных средах была незначительна, около 10% [11–13], и не превышала 30% для производных, полученных в нейтральных средах с предварительной защитой аминогруппы органическими соединениями или ионными ПАВ [11, 14, 15], что не позволило получить растворимые в нейтральных средах продукты. Кроме того, получение О-кватернизованных производных с использованием в качестве прекурсоров бензилиден- или фталоил-хитозанов было сопряжено со сложностями снятия защиты аминогруппы в жестких условиях, что приводило к частичной деструкции полисахарида. Таким образом, получение растворимых производных хитозана с сохранением первичных аминогрупп остается актуальной задачей, решение которой и является целью настоящей работы.

МЕТОДИКА

Материалы. ХТЗ производства ЗАО “Биопрогресс” (Россия) (степень деацетилирования исходного хитина 90%, массовая доля золя 5%) очищали осаждением раствором щелочи из кислых растворов, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и лиофильно высушивали. N-кватернизованный хитозан получали по модифицированной методике, описанной в работе [16]. Значения молекулярной массы (**Mw**) образцов исходного ХТЗ и N-мХТЗ, определенное методом статического светорассеяния в 0.33 М уксусной кислоте, содержащей 0.2 моль/л ацетата натрия, составили соответственно 280×10^3 и 250×10^3 Да.

Полистиролсульфонат натрия (**ПССNa**) (“Du Pont”, Франция — США) с Mw = 74×10^3 Да, ГТМАХ, додецилсульфат натрия (**ДДС**), концентраты буферов PBS, TRIS, HEPES and MES (“Sigma-Aldrich”, США), а также хлористый натрий, едкий натр, уксусную и соляную кислоту квалификации “х.ч.” (“ЛабТех”, Россия), ацетон и диметилсульфоксид (**ДМСО**) квалификации “х.ч.” (“Экос-1”, Россия), а также этиловый спирт (“Химмед”, Россия) применяли без дополнительной очистки. Для приготовления водных растворов использовали бидистиллированную воду.

Натриевую соль ДНК из тимуса теленка (~10000 пар оснований) фирмы “Sigma” (США) применяли без дополнительной очистки. Концентрацию фосфатных групп [P] в растворах нуклеиновой кислоты определяли с помощью УФ-спектрофотомерии, используя закономерности работы [17].

Получение прекурсора ДДС/ХТЗ. Комплексы ДДС/ХТЗ различного состава (1/1; 3/2; 2/1) получали, смешивая кислые растворы ХТЗ и ДДС согласно методике, описанной в работе [18]. Состав комплексов выражали в мольных отношениях сульфонатных групп ДДС к первичным аминогруппам ХТЗ. Например, для приготовления комплекса ДДС/ХТЗ состава 1 : 1, раствор ДДС (2.5 г (8.67ммоль) в 35мл 2%-ной уксусной кислоты) медленно приливали к раствору ХТЗ (1.5 г (8.2 ммоль) в 100 мл 2%-ной уксусной кислоты) при непрерывном перемешивании. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч, продолжая перемешивать. Выпавший осадок собирали на фильтре Шотта, многократно промывали дистиллированной водой, сушили при 70°C до постоянного веса. Соотношение серы к азоту определяли методом спектроскопии ЯМР^{1}H.

Синтез О- и N, О-кватернизованных хитозанов. К раствору комплекса ДДС/ХТЗ (1.0 г) в 40 мл ДМСО добавляли ГТМАХ равными порциями по 0.7 мл 3 раза с интервалом 2 ч. Реакцию проводили в термостатируемом ректоре при температуре 70°C и непрерывном перемешивании в течение 14 ч; реакционную смесь выдерживали при 4°C 12 ч. Осадок собирали с помощью центрифугирования при 5000 об/мин, 15 мин. Продукт промывали этанолом, осаждали на центрифуге, декантировали жидкую фазу; промывку осадка этанолом повторяли 4–5 раз. После сушки продукт растворяли в 16 мл 0.7 н раствора NaOH и осаждали этанолом (70 мл), собирали осадок с помощью центрифугирования, подсушивали. Повторно переосаждали продукт из щелочного раствора этанолом и высушивали. Полученный осадок растворяли в воде (20 мл). Раствор помещали в диализный мешок “SERVA MWCO 10000” (“Spectra”, США) и проводили диализ против воды, которую многократно меняли. Отмывку проводили до достижения нейтральных значений pH промывных вод; отсутствию поглощения при длине волны 230 нм в их УФ-спектрах. Раствор мХТЗ высушивали лиофильно.

Для потенциометрических измерений использовали pH-метр “Beckman Ф-70”

с комбинированным электродом “Futura Plus” (США). Растворы навесок модифицированного хитозана (концентрация в пробе 1 мг/мл) в 0.007 н растворе соляной кислоты титровали 0.1 М раствором щелочи с интервалом 3 мин между добавлением порций титранта при постоянном перемешивании в токе аргона и при температуре 22°С.

Измерения ζ-потенциала и размеров частиц, образующихся в смесях полимеров, проводили при 25°С на приборе “Zetasizer NanoZD” (“Malvern Instruments”, Англия) в буферных растворах. Концентрация аминогрупп мХТЗ в образце до титрования раствором ПССNa ([ПССNa] = 5×10^{-3} моль/л) была одинаковой и равной 6.0×10^{-4} моль/л.

Комплексы модифицированных ХТЗ с ДНК готовили в 0.01 М растворах буферов TRIS, HEPES и MES при pH 9.0, 7.4 и 5.5 при разных мольных соотношениях компонентов, выраженных как [N] : [P], где [N] — концентрация аминогрупп мХТЗ, [P] — концентрация фосфатных групп ДНК.

ИК-спектры образцов исходного ХТЗ и мХТЗ регистрировали на приборе “Perkin Elmer Spectrum One” (США), оснащенном универсальной приставкой ATR с однократным отражением от поверхности кристалла Diamant Zn–Se.

Спектры ЯМР растворов исходного ХТЗ и мХТЗ в дейтерированной соляной кислоте и D_2O соответственно регистрировали на спектрометре “VNMR400” (“Varian”, США) с рабочей частотой 400 МГц на ядрах ^1H и 100 МГц на ядрах ^{13}C. Химические сдвиги измеряли относительно остаточных протонов растворителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения задачи получения растворимых производных хитозана с сохранением его первичных аминогрупп был выбран 2-стадийный способ модификации (рис. 1), предусматривающий предварительную защиту аминогрупп на 1 стадии, взаимодействие ГТМАХ с гидроксильными группами полисахарида на второй и последующее снятие защиты с аминогруппы [11]. В метод были внесены существенные изменения, касающиеся стадий кватернизации и очистки продуктов модификации, позволившие значительно повысить эффективность процесса. Для защиты аминогруппы использовали ДДС как реагент, обеспечивающий наиболее простой способ проведения защиты аминогрупп путем получения комплекса ДДС/ХТЗ, а также ее снятия разрушением комплекса. Получение комплекса ДДС/ХТЗ проводили в ДМСО при различных соотношениях компонентов. В табл. 1 приведены данные о влиянии состава исходной смеси на соотношение сульфо- и аминогрупп в комплексе, определенное по данным протонного магнитного резонанса (**ПМР**) как отношение интегральных интенсивностей сигналов с химическими сдвигами при 0.85 и 2.85 ppm, относящихся к группам CH_3 ДДС и группам H_2 ХТЗ соответственно.

Согласно полученным результатам для полного экранирования первичных аминогрупп ХТЗ необходим двойной избыток ДДС, что совпадает с данными, полученными ранее в работах [11, 18].

На второй стадии проводили реакцию полученных прекурсоров — комплексов ДДС/ХТЗ с ГТМАХ. Продукты реакции выделяли,

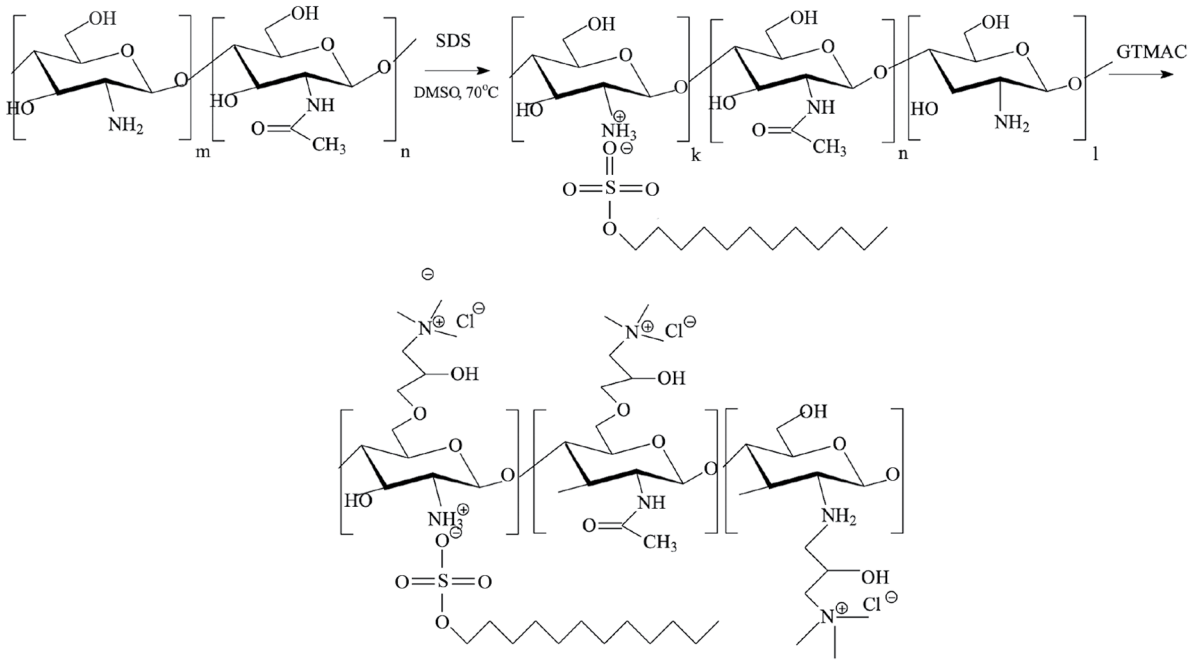

Рис. 1. Схема двухстадийного синтеза мХТЗ.

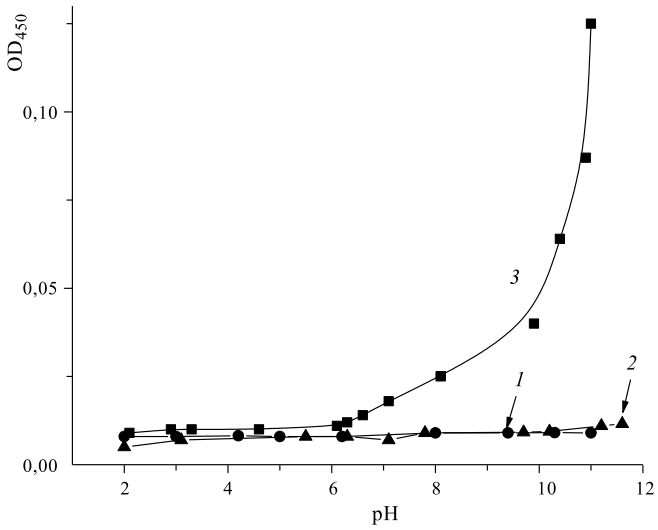

Рис. 2. Оптическая плотность при 450 нм водных растворов образцов N-мХТЗ (*1*), мХТЗ-1 (*2*), мХТЗ-3 (*3*) в средах с различными значениями pH.

удаляли защиту с аминогрупп, растворяя полученные продукты в 1н NaOH с последующим переосаждением полученного раствора этанолом, процедуру повторяли несколько раз. Для полного удаления ДДС требовалось проведение дополнительной очистки продукта диализом. Следует отметить, что предложенный в работах [11, 18] способ выделения и очистки продукта с использованием только диализа против 15%-ного раствора TRIS не позволял полностью удалить защиту с аминогрупп.

Растворимость образцов модифицированного ХТЗ определяли методом турбидиметрического титрования. Согласно данным, приведенным на рис. 2, образец мХТЗ-3, полученный с полной защитой аминогрупп, при соотношении $[SO_3]/[NH_2]$, равном 2 : 1, ограниченно растворялся в водных средах, тогда как образец с частичной защитой аминогруппы мХТЗ-1 обладал растворимостью сопоставимой с растворимостью N-модифицированных продуктов. Это позволило предположить, что в этом случае реакция с ГТМАХ протекала также и по аминогруппам.

Таблица 1. Состав реакционной смеси и прекурсоров ДДС/ХТЗ

Образец	$[SO_3] : [NH_2]$	
	в реакционной смеси	в прекурсоре
мХТЗ-1	1 : 1	1 : 1.6
мХТЗ-2	3 : 2	1 : 1.1
мХТЗ-3	2 : 1	1 : 1

Структуру полученных продуктов анализировали спектральными методами. На рис. 3 приведены ИК-спектры исходного ХТЗ и продуктов его модификации, полученных прямой реакцией по аминогруппе и двухстадийным способом с частичной и полной защитой аминогрупп. О наличии четвертичной аминогруппы в продуктах модификации свидетельствовало появление интенсивной полосы при 1477 см$^{-1}$, относящейся к метильным группам при четвертичном атоме азота [16, 19–21]. Основное различие между спектрами производных ХТЗ, полученных разными способами, заключалось в интенсивности полосы 1590 см$^{-1}$, относящейся к первичной аминогруппе. В табл. 2 приведены данные об относительных интенсивностях характеристических полос в ИК-спектрах всех исследуемых образцов, определенные с использованием

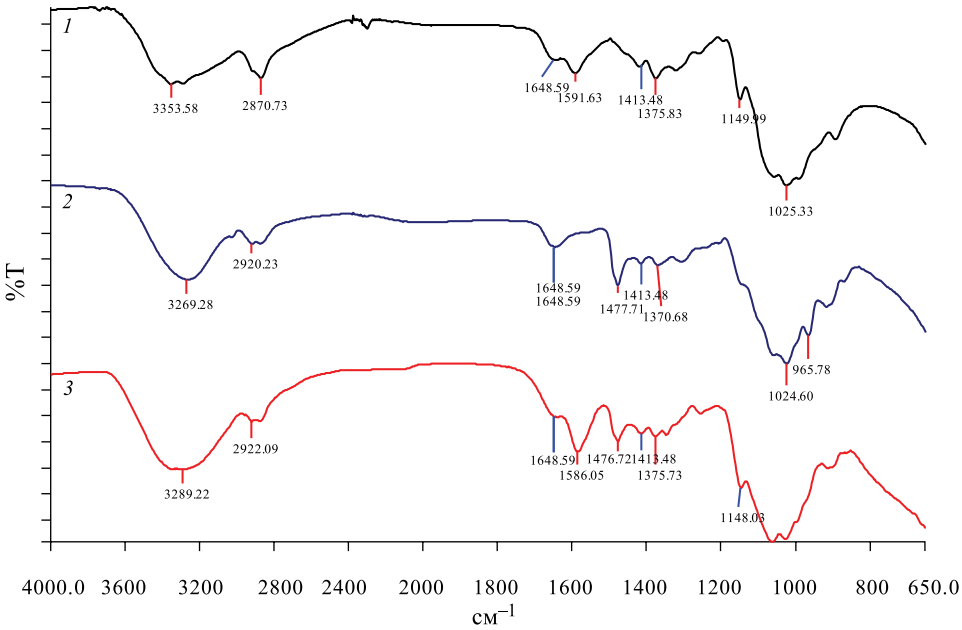

Рис. 3. ИК-Фурье-спектры образцов ХТЗ (*1*), N-мХТЗ (*2*), мХТЗ-1 (*3*).

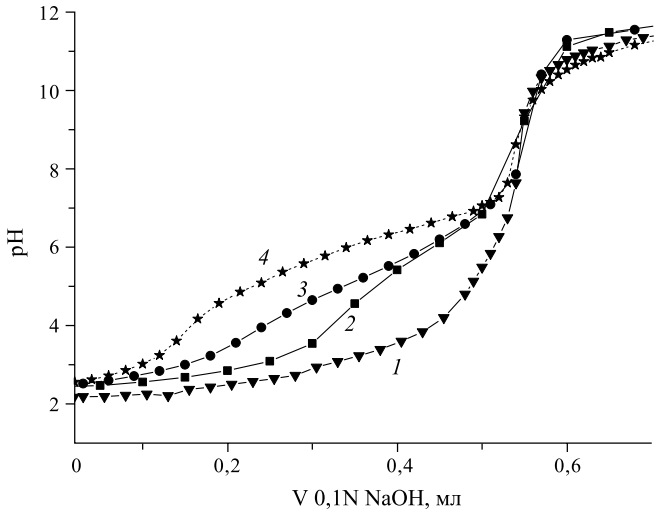

Рис. 4. Кривые потенциометрического титрования образцов N-мХТЗ (*1*), мХТЗ-1 (*2*), мХТЗ-3 (*3*), исходный ХТЗ (*4*).

в качестве внутреннего стандарта полосы 1415 см$^{-1}$. Там же приведены значения степеней модификации продуктов, определенные по данным ПМР, и значения содержания аминогрупп, рассчитанные по данным потенциометрического титрования.

Интенсивность полосы 1580 см$^{-1}$ первичных аминогрупп в спектрах исходного ХТЗ и мХТЗ-3 была практически одинаковой, что подтверждало эффективность защиты аминогрупп выбранным способом. В спектре N-замещенных производных, полученных одностадийной реакцией, этой полосы нет. В то же время в спектре продуктов, полученных при частичном экранировании первичных аминогрупп мХТЗ-1, эта полоса присутствовала, и ее интенсивность была пропорциональна степени замещения первичных аминогрупп. Данные хорошо согласуются с результатами определения количества первичных аминогрупп методом потенциометрического титрования, представленными на рис. 4. Значения степени кватернизации, рассчитанные из данных потенциометрии, для продуктов, полученных одностадийным и двухстадийным синтезом при полном экранировании аминогруппы, составили 99.5 и 40% соответственно. Высоких степеней замещения удалось достичь за счет дробного внесения ГТМАХ в реакционную среду, что позволило сократить его потери из-за частичного разрушения эпоксидных циклов в условиях реакции. Однако данные ИК-спектроскопии не позволяют однозначно определить положение кватернизованного фрагмента, поэтому структуру продуктов модификации, полученных разными способами, исследовали методом спектроскопии ЯМР.

На рис. 5 приведены спектры ЯМР ^{13}C модифицированных продуктов, полученных одностадийным способом и при различных степенях защиты первичной аминогруппы, а в табл. 3 — положение сигналов углерода, при отнесении которых пользовались литературными данными [22, 23]. В спектрах всех образцов присутствовали сигналы с химическим сдвигом 54.6 ppm, соответствующие углероду метильной группы при атоме азота. Вместе с тем сигналы αCH_2, 2CH, $6CH_2$ различались по положению в спектрах образцов N-мХТЗ и O-замещенных продуктов с полной защитой NH_2-групп мХТЗ-3. В спектрах продуктов с частичной защитой аминогруппы мХТЗ-1 присутствовали сигналы двух типов, что подтверждало протекание реакции как по гидроксильной, так и по аминогруппе.

Таким образом, частичная защита аминогруппы до реакции с ГТМАХ приводила к получению продуктов с высокими степенями модификации, содержащих при этом первичные аминогруппы. Очевидно, что именно кватернизация части аминогрупп позволила получить продукты, обладающие растворимостью во всем диапазоне pH.

Смешанный тип замещения не только обеспечивал растворимость при разных pH, но и приводил к получению поликатионов, несущих на цепях три типа аминогрупп: первичные, вторичные и четвертичные, наличие которых могло существенно влиять на характер образования и свойства их комплексов с отрицательно заряженными соединениями. Исследование поведения модифицированных продуктов в реакциях комплексообразования проводили на примере модельного полианиона — ПССNa, являющегося сильным полиэлектролитом, заряд которого не зависит от pH

Таблица 2. Относительные интенсивности характеристических полос в ИК-спектрах образцов ХТЗ и мХТЗ, значения степеней кватернизации и содержания NH_2-групп

Образец	$A_{отн}$ 1580 см$^{-1}$ NH_2	$A_{отн}$ 1477 см$^{-1}$ $N(CH_3)_3$	Степень кватернизации, % масс.*	Содержание NH_2, % масс.**
Хитозан	1.3	0	0	90
N-мХТЗ	0	1.27	99.5	0
мХТЗ-3	1.3	1.05	40.5	88
мХТЗ-1	1.04	1.24	90	54

*По данным ЯМР^{1}H; **по данным потенциометрического титрования.

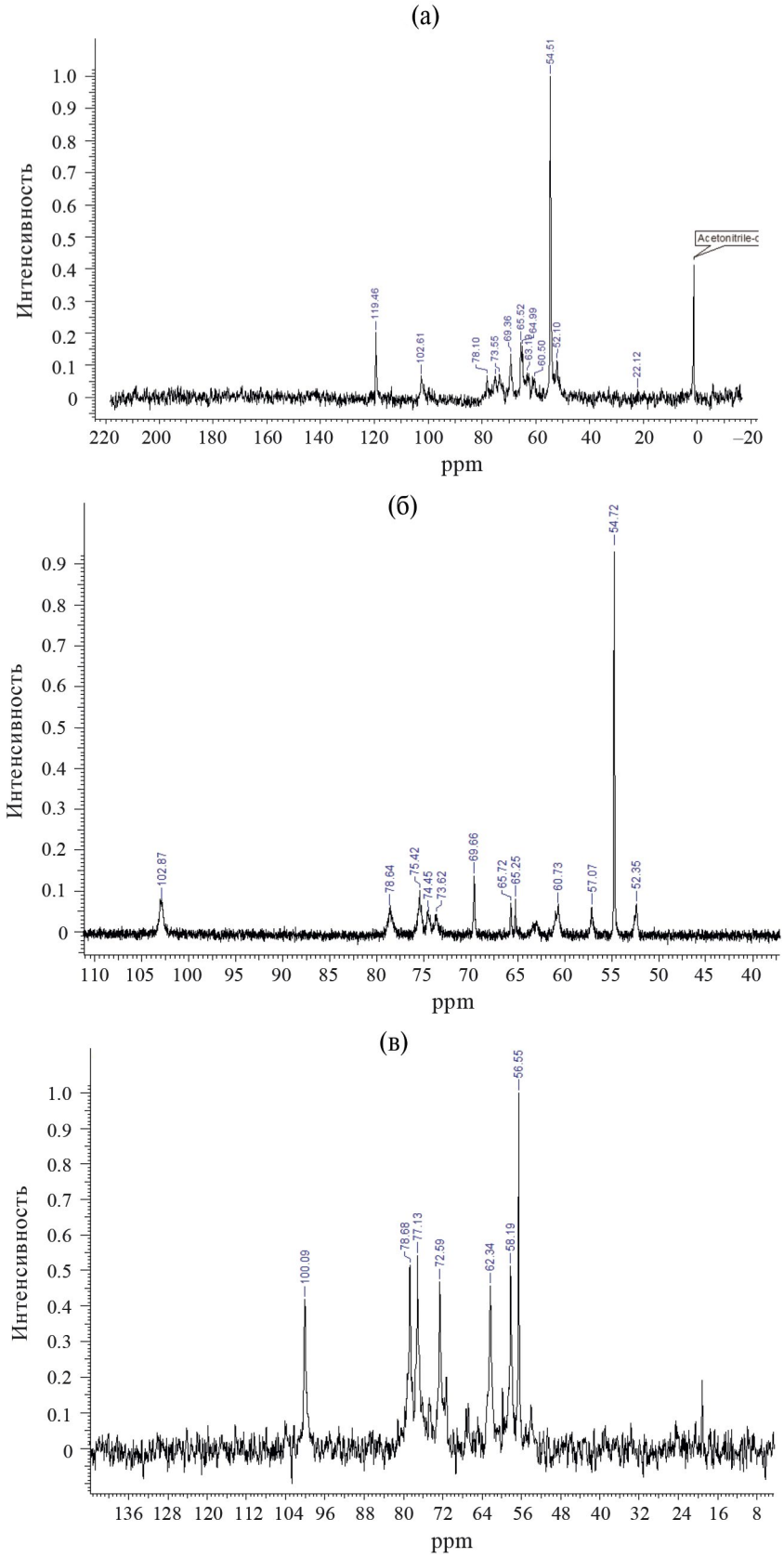

Рис. 5. Спектры ЯМР ^{13}C модифицированных продуктов N-мХТЗ (а), мХТЗ-1 (б) и мХТЗ-3 (в) в D_2O.

Таблица 3. Положение сигналов углерода в спектрах ЯМР ^{13}C модифицированных продуктов

Образец	Группа/положение сигнала, ppm			
	αCH_2	2 CH	6 CH_2	$CH_3(N)$
N-мХТЗ	52.3	62.9	61.7	54.6
мХТЗ-3	74.6	58.2	72.4	56.7
мХТЗ-1	52.2 и 75.3	57.1 и 62.9	60.9 и 69.6	54.6

среды, что значительно упростило интерпретацию полученных результатов. Готовили комплексы разного состава в средах с разными значениями pH (9.0, 7.4, 5.5) и измеряли ζ-потенциал полученных частиц. Концентрация [$-SO_3^-$] групп в полианионе была постоянной и составляла 6×10^{-4} моль/л; измерения проводили при 25°C. Выбор сред для исследования был обусловлен практическими соображениями. Для возможного применения систем на основе этих поликатионов в медицине важны среды с pH 7.4, отвечающие физиологическим условиям, и слабокислые среды с pH 5.5, характерным для некоторых клеточных органелл, например лизосом, а также для патологических клеток. Щелочные среды с pH 9.0 выбраны для выявления вклада четвертичных аминогрупп модифицированных ХТЗ, поскольку при таких значениях pH именно они определяют заряд поликатиона. В нейтральных и слабокислых средах заряжаются как первичные, так и вторичные аминогруппы, внося свой вклад в процесс образования комплексов.

Составы комплексов модифицированных ХТЗ и ПССNa, отвечающих точке нейтрализации, то есть равному количеству положительных и отрицательных зарядов в комплексах, представлены в табл. 4. При титровании поликатионов в слабощелочных средах, где заряжены только их четвертичные аминогруппы, для достижения точки эквивалентности как для N-мХТЗ, так и для мХТЗ-1 необходимо добавить эквивалентное количество групп $-SO_3^-$. При переходе в нейтральные среды для нейтрализации поликатионов требуется избыточное количество полианиона: для N-мХТЗ, в молекулах которого присутствуют вторичные аминогруппы, необходимо добавить избыток в 0.17 моля, а для мХТЗ-1, который содержит и вторичные и первичные аминогруппы, необходим избыток в 0.6 моля. Еще значительнее эта разница становится в кислых средах, где степень ионизации первичных аминогрупп возрастает.

Полученные результаты показали зависимость состава комплексов, соответствующих точке нейтрализации, от pH среды и хорошо согласовывались с содержанием первичных аминогрупп, определенным по результатам потенциометрического титрования (табл. 2).

Как уже упоминалось выше, одним из возможных применений модифицированных ХТЗ является создание на их основе систем трансфекции — полиплексов, при этом ключевым параметром для достижения эффективности действия являются размеры полиплексов. Влияние структуры поликатионов на образование и свойства их комплексов с ДНК изучали на примере ДНК тимуса теленка. Были приготовлены растворы комплексов с образцами N-мХТЗ и мХТЗ-1 в фосфатном буфере и методом динамического светорассеяния определены их размеры. На рис. 6 приведены размеры комплексов, полученных при разном мольном соотношении компонентов. Как видно из рис. 6, размеры комплексов с образцом мХТЗ-1 были меньше, чем с N-мХТЗ при всех соотношениях компонентов. Поскольку содержание четвертичных аминогрупп в образцах имеет близкие значения, можно

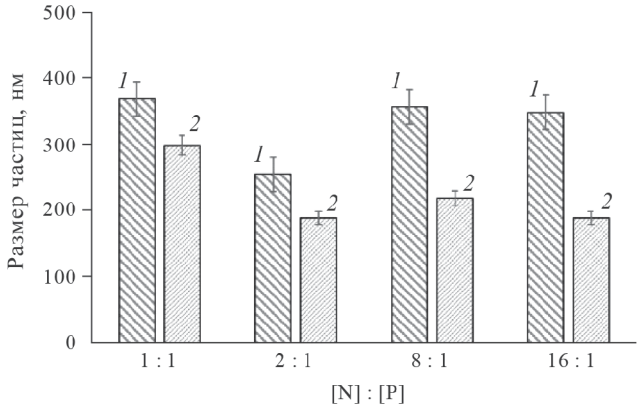

Рис. 6. Размеры частиц полиплексов, полученных при разном соотношении компонентов мХТЗ/ДНК (фосфатный буфер, pH 7.4): *1* — N-мХТЗ; *2* — мХТЗ-1.

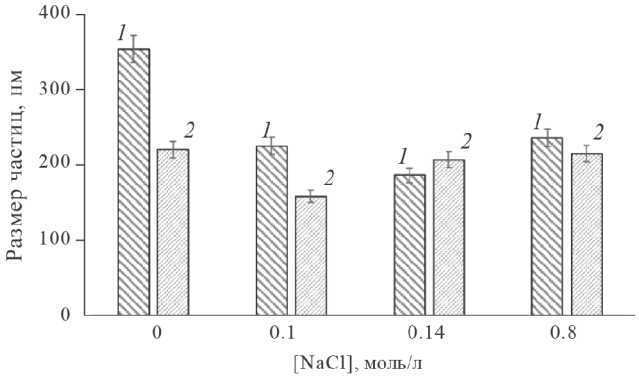

Рис. 7. Размеры частиц полиплексов состава мХТЗ/ДНК = 8 : 1 в растворах фосфатного буфера с pH 7.4 при различной концентрации соли NaCl: *1* — N-мХТЗ/ДНК, *2* — мХТЗ-1/ДНК.

Таблица 4. Состав комплексов ПССNa/мХТЗ в точке нейтрализации в средах с различными значениями pH

Образец	Соотношение –/+ в точке нейтрализации*		
	9.0	7.4	5.5
мХТЗ-1	1.0	1.6	2.2
N-мХТЗ	1.0	1.17	2.0

*(–/+) — мольное отношение сульфонатных групп ПССNa к аминогруппам мХТЗ.

предположить, что уменьшение размеров обусловлено вкладом первичных аминогрупп в связывание и, вероятно, более компактной конформацией макромолекул мХТЗ-1.

Стабильность полиплексов в физиологических условиях является параметром, определяющим возможность их практического использования. Была исследована стабильность комплексов мХТЗ-ДНК в фосфатном буфере. На рис. 7 приведены размеры комплексов, определенные при различных концентрациях соли в буферном растворе. Увеличение концентрации соли до ее значений в физиологических условиях (0.14 М) не приводило к увеличению размеров частиц или появлению мультимодальности, то есть к разрушению полиплексов. Более того, размеры комплексов практически не изменялись и при высоких концентрациях соли — вплоть до 0.8 моль/л. Полученные данные позволяют сделать вывод, что полиплексы обладают стабильностью в условиях близких к физиологическим.

***

Таким образом, разработан метод получения производных ХТЗ, содержащих три типа аминогрупп (первичные, вторичные и четвертичные) и обладающих растворимостью во всем диапазоне pH. Структура полученных продуктов изучена спектральными методами. Показано, что для получения растворимых продуктов необходимо наличие 50% кватернизованных аминогрупп. Разница в pH-чувствительности N- и N-, O-модифицированных продуктов выявлена на примере их комплексов с модельным полианионом — ППСNa. Продемонстрирована возможность получения на основе мХТЗ комплексов с ДНК — полиплексов, обладающих стабильностью в условиях близким к физиологическим. Показано, что наличие первичных аминогрупп на цепях поликатионов приводит к уменьшению размеров полиплексов. Полученные результаты могут составить основу для разработки систем доставки лекарственных средств и генетического материала.

Авторы выражают благодарность сотрудникам АО “Институт пластмасс” И.М. Шелониной и С.Г. Алексеевой за выполнение спектральных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках государственного задания Института нефтехимического синтеза РАН за счет средств бюджета института. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Harugade A., Sherje A. P., Pethe A.* // React. Func. Polym. 2023. V. 191. P. 105634. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105634
2. *Verma D., Okhawilai M., Goh K. L., Thakur K. V., Senthilkumar N., Sharma M., Uyama H.* // Environ. Res. 2023. V. 235. P. 116580. https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116580
3. *Горшенин Д. С., Жернов Ю. В., Кривцов Г. Г., Хаитов М. Р.* // Иммунология. 2020. Т. 41. № 5. С. 470–478. https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-5-470-478
4. *Iqbal Y., Ahmed I., Irfan M. F., Chatha S. A. S., Zubair M., Ullah A.* // Carbohyd. Polym. 2023. P. 121318. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121318
5. *Tang W., Wang J., Hou H., Li Y., Wang J., Fu J. et al.* // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 240. P. 124398. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124398
6. *Горшкова М. Ю., Волкова И. Ф., Алексеева С. Г., Молоткова Н. Н., Скорикова Е. Е., Изумрудов В. А.* // Высокомолекулярные соединения. Сер. А. 2011. Т. 53. № 1. С. 60–69.
7. *Yevlampieva N. P., Gubarev A. S., Gorshkova M. Yu., Okrugin B. M., Ryumtsev E. I.* // J. Polym. Res. 2015. V. 22. P. 166. https://doi.org/10.1007/s10965-015-0802-7
8. *Izumrudov V. A., Volkova I. F., Gorshkova M. Yu.* // Eur. Polym. J. 2013. V. 49. P. 3302–3308. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.07.003
9. *Faizuloev E., Marova A., Nikonova A., Volkova I., Gorshkova M., Izumrudov V.* // Carbohydr. Polym. 2012. V. 89. № 4. P. 1088–1094
10. *Wan A., Xu Q., Yan Sun Y., Li H.* // J. Agric. Food Chem. 2013. V. 61. P. 6921–6928. https://doi.org/10.1021/jf402242e
11. *Gruškienė R., Deveikytė R., Makuška R.* // Chemija. 2013. V. 24. № 4. P. 325–334.
12. *Belalia R., Grelier S., Benaissa M., Coma V.* // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. P. 1582. https://doi.org/10.1021/jf071717
13. *Dormard A., Rinaudo M., Terrassin C.* // Int. J. Biol. Macromol. 1986. V. 8. P. 105–107.

14. *Makuska R., Gorochovceva N.* // Carbohydr. Polym. 2006. V. 64. № 2. P. 319–327.
15. *Holappa J., Nevalainen T., Savolainen J., Soininen P., Elomaa M., Safin R., Suvanto S., Pakkanen T., Masson M., Loftsson T., Järvinen T.* // Macromolecules. 2004. V. 37. № 4. P. 2784–2789.
16. *Lim S. H., Hudson S. M.* // Carbohydr. Res. 2004. V. 339. № 2. P. 313–319.
17. *Olins D. E., Olins F. L., von Hippel P.* H. // J. Mol. Biol. 1967. V. 24. № 2. P. 157–176. https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90324-5
18. *Cai G., Jiang H., Tu K., Wang L., Zhu K.* // Macromol. Biosci. 2009. V. 9. P. 256–261. https://doi.org/10.1002/mabi.200800153
19. *Loubaki E., Sicsic S., Le Goffic F.* // Eur. Polym. J. 1989. V. 25. P. 379–384.
20. *Беллами И.* Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул. М: Мир, 1971. 318 с.
21. *Nakanishi Von K.* Infrared Absorption Spectroscopy. Tokio: Verlag Holden-Day, Inc., San Francisco und Nankodo Co. 1962.
22. Леви Г., Нельсон Г. Руководство по ЯМР ^{13}C для химиков-органиков. М.: Мир, 1975.
23. *Le Roy F., Jolnson, Jankowski W. G.* Carbon ^{13}C-NMR Spectra. New York; London; Sidney, Toronto: Wiley, 1972.

Functional Derivatives of Chitosan, Soluble in Neutral Medium as Drugs and Genetic Material Carrier: Preparation and Properties

M. Yu. Gorshkova[a], *, E. S. Gigoryan[a], and I. F. Volkova[a]
A. V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis RAS, Moscow, 119991 Russia
**e-mail: mgor@ps.ac.ru*

Method of chitosan modification, providing controlled addition of the quaternized block has been proposed. The structure of the products obtained were studied by FT-IR and NMR spectroscopy; their solubility and acid-base properties was characterized by turbodimetry and potentiometry, respectively. Presence about 50% of quaternized amino groups was shown to be necessary to obtain soluble products. The difference in pH-sensitivity of modified derivatives with different types of quaternized block attachment was revealed by studying their interaction with a model polystyrene sulfonate anion. The possibility of preparing complexes based on the obtained derivatives with DNA — polyplexes, stable under conditions close to physiological ones has been demonstrated. It was shown the presence of primary amino groups on the polycation chains leads to a decrease in the polyplexe size. The data obtained can form the basis for development of drug and genetic material delivery system.

The 2-stage method of chitosan modification providing controlled addition of the quaternized block has been proposed. The structure of the products obtained were studied by FT-IR and NMR spectroscopy; their solubility and acid-base properties was characterized by turbodimetry and potentiometry, respectively. The presence about 50% of quaternized amino groups was shown to be necessary to obtain soluble products. The difference in pH-sensitivity of modified derivatives with different types of quaternized block attachment was revealed by studying their interaction with a model polystyrene sulfonate anion. The possibility of preparing complexes based on the obtained derivatives with DNA, polyplexes stable under conditions close to physiological ones has been demonstrated. It is shown that the presence of primary amino groups on the polycation chains leads to a decrease in the polyplexe size. The data obtained can form the basis for development of drug and genetic material delivery systems.

Keywords: chitosan, soluble chitosan derivatives, quartenized chitosan derivatives, drug delivery systems, polyplexes, transfection

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 143–150

УДК 547.728.23

СОЗДАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО КОМПОЗИЦИОННОГО АЭРОГЕЛЯ БИОМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА АЛЬГИНАТ–ХИТОЗАН И КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ

© 2024 г. Н. А. Горшкова[1, *], О. С. Бровко[1], И. А. Паламарчук[1], А. Д. Ивахнов[1, 2], Н. И. Богданович[2], Т. Я. Воробьева[1]

[1]Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н. П. Лаверова УрО РАН, Архангельск, 163020 Россия

[2]Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова, Архангельск, 163000 Россия

*e-mail: nat.gorshkova@mail.ru

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.
После доработки 03.11.2023 г.
Принята к публикации 05.11.2023 г.

На основе полиэлектролитного комплекса альгинат натрия–хитозан с включением микрочастиц карбоната кальция синтезированы аэрогельные композиты. Показано, что текстурные характеристики материалов не зависели от морфологии частиц карбоната кальция: площадь удельной поверхности аэрогелей составляла 380–400 м^2/г. Развитая пористая структура композитов наряду с полиэлектролитной природой определяла их высокое влагопоглощение — до 110 г/г. Для придания антимикробных свойств материалы импрегнировали атранорином, выделенным из лишайника *Hypogymnia physodes*, обладающим выраженным ингибирующим действием относительно бактерии *Proteus mirabilis*, являющейся основным возбудителем раневых инфекций. Минимальная подавляющая концентрация атранорина составляла 1 мг/мл. Высвобождение основного количества атранорина (до 50%), включенного в матрицу аэрогельного материала, происходило в течение 4 ч.

Ключевые слова: хитозан, альгинат, аэрогель, карбонат кальция, раневое покрытие, лишайник *Hypogymnia physodes*, атранорин, сверхкритическая сушка, доставка лекарств, антибактериальная активность

DOI: 10.31857/S0555109924020038 **EDN:** GAZTPG

Важным направлением современной биомедицины является разработка новых подходов к созданию материалов на основе биосовместимых полимерных матриц для восстановления кожных покровов и исследование их свойств. Биополимерные конструкции могут служить резорбируемой основой биомедицинских изделий, предназначенных для замещения поврежденной ткани, или выполнять роль раневых покрытий. Основное требование, предъявляемое к материалам для регенерации тканей, заключается в обеспечении протекания репарационных процессов не только на поверхности, но и во всем объеме восстанавливаемого участка ткани, что достигается при наличии в структуре материала системы связанных, сообщающихся пор, в которых происходит инфильтрация клеток организма, их рост, подвод питательных веществ и кислорода, а также отвод продуктов жизнедеятельности. В поры могут вводиться факторы роста, клеточные культуры, биологически активные или лекарственные препараты, которые обеспечивают контроль воспалительных процессов и способствуют более активной регенерации ткани [1–3].

Достаточно часто в качестве полимерных матриц медицинского назначения используют органические аэрогели (**АГ**) — наноструктурные высокопористые материалы, обладающие чрезвычайно низкой плотностью, большой удельной поверхностью и высокой пористостью. При этом для их получения предпочтительнее использовать биополимеры, обладающие собственной физиологической активностью, поскольку в этом случае биологическое действие (бактериостатическое, противовирусное, антикоагуляционное и др.) полимерной матрицы проявляется даже без введения в структуру дополнительных активных веществ [4, 5]. Наиболее перспективными компонентами для создания биоактивных аэрогельных композиций являются полиэлектролитные комплексы (**ПЭК**) альгината натрия (**АЛГ**) и хитозана (**ХТЗ**) [6–8]. Оба полисахарида АЛГ и ХТЗ активно используют как биосовместимые, биорезорбируемые и биоадгезивные соединения в медицинских и фармацевтических целях, в том числе в качестве каркасов для тканевой инженерии, раневых покрытий, гемостатических агентов с антитромбогенными

свойствами и стимуляторов иммунной системы против вирусных и бактериальных инфекций [9, 10]. Следует отметить, что однокомпонентные материалы на основе АЛГ или ХТЗ значительно уступают материалам на основе ПЭК АЛГ-ХТЗ в связи с неконтролируемым распадом полимерной матрицы во влажной среде даже при нейтральном pH [11, 12], в то время как совместное применение АЛГ и ХТЗ в виде ПЭК обеспечивает формоустойчивость материалов во влажном состоянии и дает синергетический эффект. Терапевтический результат двухкомпонентной системы в несколько раз выше суммарного воздействия тех же компонентов, работающих по отдельности [13].

Одним из основных направлений исследования при создании аэрогельных материалов является изучение возможности управления текстурными характеристиками материала. В частности, интерес вызывает использование в качестве порообразующих агентов специальных неорганических шаблонов или темплатов — инертных частиц, не растворимых в полимерной смеси, вокруг которых формируется полимерная матрица. Последующее удаление этих частиц из структуры полимерного материала приводит к появлению на их месте пустот, то есть пор [14]. Среди используемых в медицине неорганических частиц благодаря своей биоразлагаемости, биоинертности, биосовместимости, доступности и низкой стоимости наиболее часто используют карбонат кальция $CaCO_3$ [15]. Известно, что $CaCO_3$ существует в трех полиморфных модификациях (ватерит, кальцит и арагонит), различающихся между собой кристаллической структурой и свойствами. При этом наибольший интерес среди них представляют частицы ватерита, поскольку только они способны иметь сферическую форму, развитую поверхность и высокую пористость. Именно такие объекты удобно использовать в качестве темплата при создании высокопористых биополимерных композитов [16]. Кроме того, частицы $CaCO_3$ могут служить источником ионов Ca^{2+}, которые в составе лечебных покрытий обладают выраженными гемостатическими свойствами [17]. Микрочастицы $CaCO_3$ обычно получают в ходе массовой кристаллизации из растворов. В зависимости от задач исследования в процессе синтеза за счет управления механизмом роста кристаллов можно регулировать физико-химические свойства частиц $CaCO_3$, которые в дальнейшем будут определять свойства полимерных материалов.

Большинство работ [18–20], посвященных созданию материалов, содержащих в качестве темплата $CaCO_3$, направлено на формирование полиэлектролитных оболочек и капсул методом послойной адсорбции полиэлектролитов. Лишь в отдельных исследованиях отмечено использование $CaCO_3$ для создания гидрогелей и макропористых скаффолдов на основе АЛГ или ХТЗ [1, 21, 22]. Оценка влияния формы частиц на пористую структуру композиционных аэрогелей (**КАГ**) на основе ПЭК АЛГ-ХТЗ, содержащих микрочастицы $CaCO_3$, до настоящего времени не проводилось. В связи с этим актуально исследование закономерностей формирования частиц $CaCO_3$ в процессе кристаллизации и изучение влияния их структуры на текстурные характеристики аэрогельных материалов.

Цель настоящей работы — получение композиционного аэрогельного материала на основе ПЭК АЛГ-ХТЗ и $CaCO_3$, оценка его физико-химических свойств и возможности использования в биомедицинских целях.

МЕТОДИКА

В работе использовали альгинат натрия (АЛГ) (“Sigma-Aldrich”, США) с молекулярной массой (**ММ**) 100 кДа и хитозан (ХТЗ) с ММ 200 кДа, степенью деацетилирования (**СД**) 0.89 (ООО “Биопрогресс”, Россия). ММ биополимеров определены методом капиллярной вискозиметрии с расчетом по уравнениям Марка–Куна–Хаувинка для ХТЗ [23] и АЛГ [24]. СД определена методом кондуктометрического титрования [25]. ПЭК в виде гидрогелей получали смешиванием водного раствора АЛГ и уксуснокислого раствора ХТЗ с концентрацией 0.25% при эквимолярном соотношении компонентов. Расчет степени связывания полиэлектролитов в комплекс и мольного состава реакционной смеси проводили, как описано в работе [7]. Для получения КАГ на стадии формирования комплекса вводили микрочастицы карбоната кальция в количестве 10% от массы ПЭК.

Частицы $CaCO_3$ получали смешиванием эквивалентных по объему 0.33 М водных растворов Na_2CO_3 и $CaCl_2$ при непрерывном перемешивании в течение 60 с со скоростью 400–800 об./мин, после чего суспензию оставляли на 5–7 мин до полной кристаллизации. Полученные частицы $CaCO_3$ трижды промывали деионизованной водой и ацетоном от не вступивших в реакцию ионов, после чего сушили в течение 1 ч при 60°C. Изображения частиц получали с помощью лабораторного микроскопа “AxioScope A1” (“Zeiss”, Германия) в комплекте с цифровой фотокамерой “Canon G10” (“Canon Inc.”, Япония). Размер частиц определяли, используя лицензионную программу “AxioVision LE Release 4.8.1”.

Для получения АГ без введения $CaCO_3$ и КАГ, содержащих $CaCO_3$, синтезированный при разной скорости перемешивания Na_2CO_3 и $CaCl_2$, водную фазу в структуре гидрогеля замещали ацетоном (99.5%, “ч.д.а.”), затем образцы сушили в токе сверхкритического CO_2 при скорости потока 1 мл/мин, температуре 40°C и давлении 10 МПа на установке MV-10ASFE (“Waters”, США). Параметры пористой структуры материалов получены

методом низкотемпературной адсорбции азота (77.4 K) на анализаторе удельной поверхности ASAP 2020 MP (“Micromeritics”, США). Влагопоглощение материалов (q, г/г) изучали гравиметрическим методом в забуференном фосфатом физиологическом растворе при температуре 37°C [26].

Атранорин (**АТ**) выделяли из лишайников вида *Hypogymnia physodes* методом сверхкритической флюидной экстракции на установке MV-10ASFE (“Waters”, США). Измельченные талломы лишайника (~1.0 г) обрабатывали сверхкритическим CO_2 при скорости потока 2 мл/мин с добавлением в качестве сорастворителя этанола (2.5 г/мин), температуре 85°C и давлении 15 МПа в течение 80 мин.

Количество АТ в экстрактах определяли методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа LCMS-2020 (“Shimadzu”, Япония) при спектрофотометрическом детектировании. Условия хроматографирования: подвижная фаза — 0.5%-ный водный раствор муравьиной кислоты: ацетонитрил (30 : 70); колонка RestekUltra C18 3.0 × 100 мм, зерно 3 мкм, скорость потока подвижной фазы 0.5 мл/мин, объем вводимой пробы 5 мкл. Для калибровки в качестве стандартного образца использовали АТ (“Sigma-Aldrich”, США). Введение АТ в матрицу КАГ проводили путем погружения материала в 40%-ный водно-спиртовой раствор АТ с последующим выдерживанием в течение 5 ч при 20°C.

Кинетику высвобождения АТ изучали в забуференном фосфатом физиологическом растворе при pH 7.4 и температуре 37°C. Количество высвободившегося АТ из материала определяли методом ВЭЖХ. Антимикробную активность АТ определяли диско-диффузионным методом. В качестве тест-культур использовали штаммы трех видов грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 и *Proteus mirabilis* ATCC3177. В качестве контроля использовались посевы, содержащие только 40%-ный этиловый спирт и чистые тест-культуры [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день существует множество подходов к синтезу частиц $CaCO_3$, большая часть которых основана на осаждении плохо растворимых кристаллов $CaCO_3$ из реакционной смеси, содержащей ионы CO_3^{2-} и Ca^{2+} [28]. Среди методов, в которых не используются экстремальные условия и сложное оборудование, широкое распространение получил метод синтеза $CaCO_3$, заключающийся в непосредственном сливании эквимолярных растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3. В момент смешения солей формируется аморфный $CaCO_3$, который с течением времени агрегирует и формирует поликристаллические сферолиты — микрочастицы ватерита [29]. Большое влияние на дисперсность частиц $CaCO_3$, их размер и морфологию оказывают условия проведения процесса: концентрация реагентов, температура, интенсивность перемешивания реакционной смеси, его продолжительность.

Наиболее доступным и легко реализуемым способом управления механизмом роста кристаллов в процессе синтеза $CaCO_3$ является изменение интенсивности перемешивания прекурсоров — солей $CaCl_2$ и Na_2CO_3, поэтому в настоящей работе был рассмотрен этот параметр. Скорость перемешивания смеси солей $CaCl_2$ и Na_2CO_3 варьировали от 400 до 1000 об./мин. С целью определения размера, морфологии и полидисперсности образцов полученные частицы $CaCO_3$ были охарактеризованы с помощью конфокальной лазерной микроскопии (рис. 1).

Как показано на рис. 1, при низкой скорости перемешивания 400 об./мин формировались частицы правильной округлой формы, размером 2.9–3.3 мкм, при этом визуализировалось значительное количество агломератов. При скорости 600 об./мин округлая форма частиц сохранялась, однако снижался размер частиц (1.5–2.0 мкм) и количество их агломератов, частицы были довольно монодисперсны. Чем быстрее соли $CaCl_2$ и Na_2CO_3 гомогенно распределялись в рабочем объеме, тем больше образовывалось центров нуклеации, что приводило к увеличению числа растущих микрочастиц и, следовательно, уменьшению их среднего размера. Оба типа полученных частиц $CaCO_3$ представляли собой ватерит с мезопористой внутренней структурой (средний размер пор 20–60 нм). Округлая форма частиц была результатом высокой скорости столкновения наночастиц $CaCO_3$. При высокой скорости перемешивания (800 об./мин) образовывалось большое количество кристаллов ромбоэдрической и сферолитной формы, при этом количество частиц значительно уменьшалась, их размер составлял 0.7–1.5 мкм. Дальнейшее увеличение скорости перемешивания до 1000 об./мин также приводило к снижению количества частиц при сохранении их размера 1.5 мкм, форма кристаллов ромбоэдрическая.

С увеличением скорости перемешивания от 400 до 1000 об./мин размер кристаллов уменьшался практически в 2 раза. Высокая скорость перемешивания (800–1000 об./мин) приводила к ориентации микрочастиц в потоке, в результате чего сокращалось время контакта кристаллов при столкновениях, что, по-видимому, снижало вероятность их срастания, а также возрастала скорость разрушения кристаллов и непрочных агломератов частиц $CaCO_3$ при столкновении друг с другом. Схожие результаты были получены в работах [30, 31].

Рассмотренный “механический фактор” имеет большое значение для дальнейшей практической реализации технологического режима массовой кристаллизации $CaCO_3$, поскольку этот параметр является одним из немногих, при помощи которого

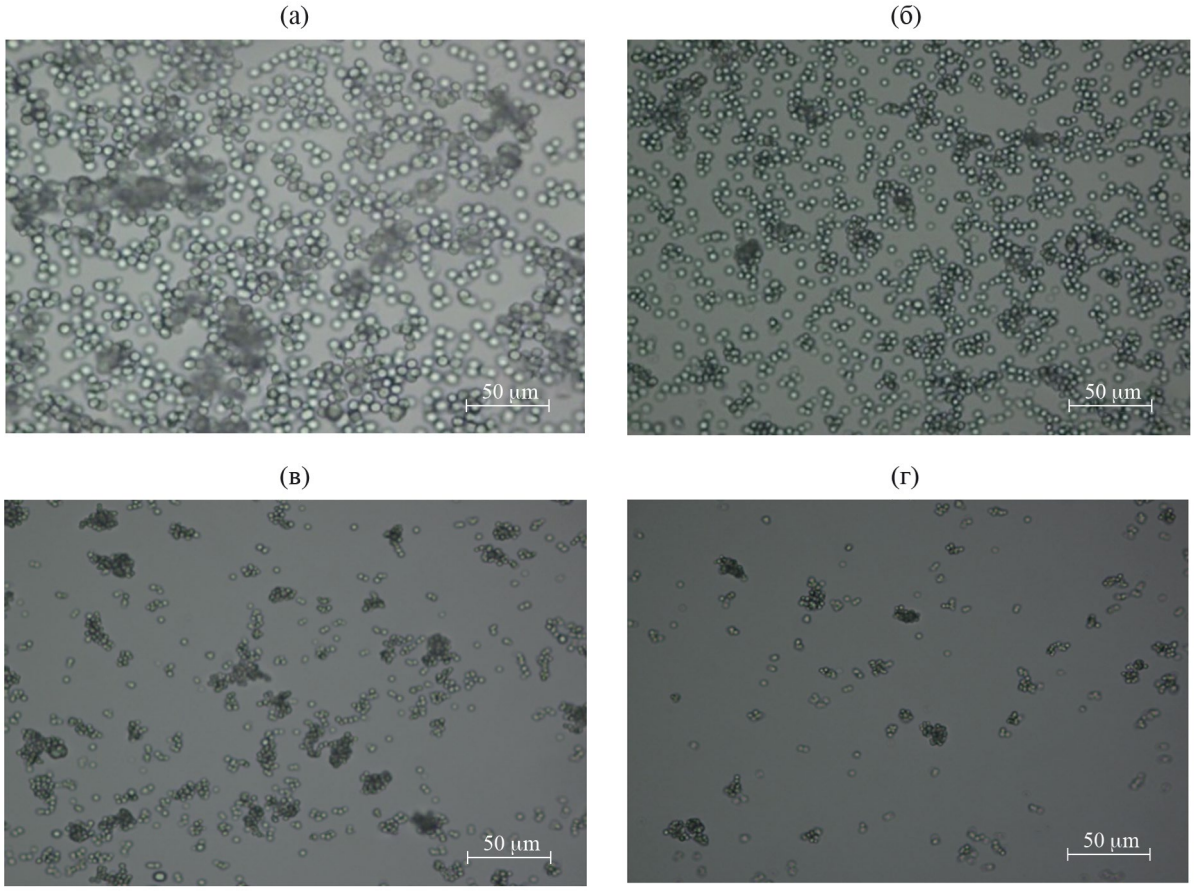

Рис. 1. Влияние скорости перемешивания солей $CaCl_2$ и Na_2CO_3 на форму и размер частиц $CaCO_3$: а — 400, б — 600, в — 800, г — 1000 об./мин.

можно легко изменять свойства синтезируемого продукта.

С целью получения КАГ на стадии синтеза ПЭК АЛГ-ХТЗ осуществляли введение микрочастиц $CaCO_3$ в систему. Смешивание АЛГ и ХТЗ приводит к формированию кислой среды реакционной смеси. В этих условиях микрочастицы $CaCO_3$ частично растворяются, что приводило к высвобождению ионов Ca^{2+}, которые обеспечивали сшивку молекул АЛГ и ХТЗ с образованием хелатных комплексов, при этом одновременно происходило формирование ПЭК АЛГ-ХТЗ. Эти процессы характеризовались снижением межфазного поверхностного натяжения в коллоидной системе, укрупнением частиц комплексов и высвобождением значительной части иммобилизованной в структурной сетке дисперсионной среды (синерезис), что приводило к увеличению прочности геля вследствие образования дополнительных контактов между частицами или макромолекулами [14]. При этом объем геля уменьшается, однако сохраняется его первоначальная форма. Внешне отличий в процессе формирования гидрогелей с микрочастицами $CaCO_3$, синтезированными при различной скорости перемешивания, не наблюдается; все гидрогели непрозрачные, белого цвета.

Полученные таким образом гидрогели сушили в среде сверхкритического диоксида углерода с предварительной последовательной заменой водной фазы в структуре гидрогеля на органическую (ацетон). В результате получено четыре образца КАГ с введением микрочастиц $CaCO_3$, синтезированных при различной скорости перемешивания: 400, 600, 800 и 1000 об./мин, обозначенных как КАГ400, КАГ600, КАГ800, КАГ1000 соответственно. Следует отметить, что все полученные КАГ приняли заданную форму и монолитность.

Текстурные характеристики КАГ, рассчитанные из изотерм адсорбции–десорбции азота, представлены в табл. 1. Все образцы характеризовались развитой мезопористой структурой и высокой удельной поверхностью 388–403 $м^2/г$, при этом нет значительных различий в текстурных характеристиках материалов.

Полученные результаты позволили сделать вывод, что размер и форма микрочастиц $CaCO_3$ не оказывали влияния на пористую структуру

полученных КАГ. Микрочастицы $CaCO_3$ выступали в роли темплата и как источник ионов Ca^{2+}, участвующих в формировании гидрогеля АЛГ-ХТЗ, в отличие от однокомпонентных систем на основе АЛГ или ХТЗ, где $CaCO_3$ использовался для создания матриц (гидрогелей, скаффолдов) с контролируемыми размерами пор в диапазоне 5–50 мкм, соответствующими размеру микрочастиц $CaCO_3$ [1, 21, 22]. Данный факт подтверждался результатами исследования текстурных характеристик АГ без введения микрочастиц $CaCO_3$, средний размер пор которого сопоставим с размером пор образцов КАГ, а площадь удельной поверхности и общий объем пор в 1.5 раза ниже. Можно предположить, что пористая структура зависит от прочности каркаса гидрогелевой сетки АЛГ-ХТЗ, которая значительно повышалась при введении $CaCO_3$ в систему, что позволяло противостоять усадочным напряжениям материала в процессе сверхкритической сушки и роли $CaCO_3$ как порообразователя.

Таким образом, при разработке технологии получения КАГ на стадии синтеза микрочастиц $CaCO_3$ можно использовать рассмотренную в настоящей работе легко реализуемую и экологически чистую методику при низкой скорости перемешивания прекурсоров, не требующую дорогостоящего оборудования и химикатов, что будет способствовать удешевлению процесса производства материалов за счет сокращения энергозатрат.

Наиболее важными параметрами при оценке материалов, используемых для регенерации тканей и в системах доставки лекарственных средств, являются скорость и степень их влагопоглощения. Способность КАГ к влагопоглощению изучали весовым методом, в качестве модельной среды использовали забуференный фосфатом физиологический раствор с pH 7.4, моделирующий раневую среду. Ввиду одинаковых текстурных характеристик, кривые влагопоглощения всех 4 образцов КАГ практически совпадали, поэтому в работе приведены результаты влагопоглощающей способности на примере образца КАГ400. Поглощение среды КАГ обусловлено простым капиллярным всасыванием и раздвижением элементов структуры вследствие возникновения расклинивающего давления с последующим заполнением образовавшихся

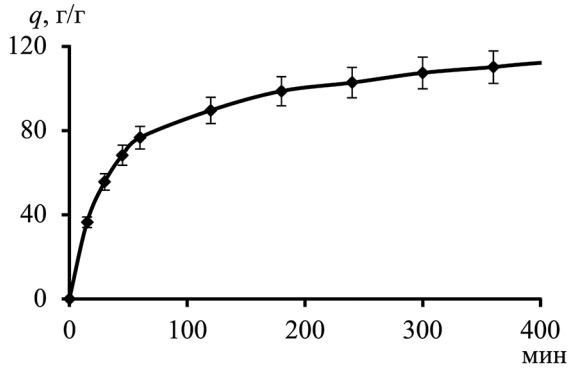

Рис. 2. Кинетика поглощения дистиллированной воды композиционным аэрогелем на основе ПЭК АЛГ-ХТЗ с включением микрочастиц $CaCO_3$, синтезированных при скорости перемешивания солей $CaCl_2$ и Na_2CO_3 400 об./мин.

промежутков жидкой средой. Представленная на рис. 2 кривая влагопоглощения КАГ400 имеет вид, характерный для ограниченно набухающих систем, и свидетельствует о высокой скорости набухания КАГ. Отметим, что максимальное влагопоглощение достигает 110 г/г, что значительно выше, чем у аэрогельных материалов на основе АЛГ или ХТЗ (7–80 г/г), и позволяет отнести полученные материалы к суперадсорбентам [32, 33]. Достоинством полученных КАГ является формоустойчивость при влагопоглощении в широком диапазоне pH, что наряду с развитой пористой структурой и полиэлектролитной природой позволит использовать полученные КАГ в качестве аппликационных материалов.

Одной из самых общих и серьезных проблем в области разработки материалов биомедицинского назначения является опасность бактериальной инфекции. В связи с этим представляет интерес изучить возможность усиления бактерицидного действия материалов посредством включения в их состав биологически активного соединения растительного происхождения, проявляющего активность в отношении штаммов микроорганизмов, устойчивых к некоторым антибиотикам и синтетическим лекарственным препаратам. В качестве активного вещества в работе использовали атранорин

Таблица 1. Текстурные характеристики композиционных аэрогелей

Образец	$S_{уд}$, м^2/г		$V_{пор}$, см^3/г			$d_{ср}$ пор, нм
	общая	мезопор	общий	мезопор	микропор	
КАГ400	388 ± 19	352 ± 17	1.90 ± 0.09	1.74 ± 0.08	0.12 ± 0.01	24.6 ± 2.0
КАГ600	400 ± 20	323 ± 16	1.93 ± 0.09	1.83 ± 0.09	0.14 ± 0.01	21.3 ± 2.1
КАГ800	403 ± 20	367 ± 18	1.82 ± 0.08	1.65 ± 0.08	0.13 ± 0.01	22.5 ± 2.5
КАГ1000	392 ± 20	357 ± 17	1.76 ± 0.08	1.71 ± 0.08	0.12 ± 0.01	19.5 ± 2.3
АГ	260 ± 13	249 ± 11	1.06 ± 0.12	1.24 ± 0.12	0.10 ± 0.01	20.2 ± 1.9

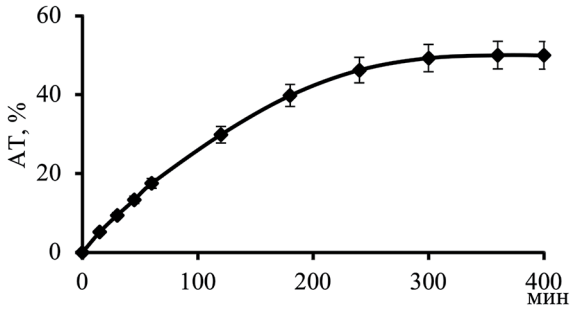

Рис. 3. Высвобождение АТ из композиционного аэрогеля на основе ПЭК АЛГ-ХТЗ с включением микрочастиц $CaCO_3$, синтезированных при скорости перемешивания солей $CaCl_2$ и Na_2CO_3 400 об./мин.

(АТ) — один из наиболее распространенных вторичных лишайниковых метаболитов, обладающий обезболивающим, противовоспалительным и антимикробным действием [34]. Поскольку предполагаемая область применения разрабатываемого материала — лечение ран, одной из задач исследования было определение антимикробной активности АТ по отношению к возбудителям раневых инфекций. В качестве тест-штаммов для определения антимикробной активности использовали три грамотрицательные бактерии *E. coli*, *P. aeruginosa* и *P. mirabilis*, которые считаются основными возбудителями раневых инфекций и характеризуются постоянно растущей устойчивостью к противомикробным препаратам. Результаты исследования антибактериальной активности АТ, выделенного из лишайника *Hypogymnia physodes*, представлены в табл. 2. При интерпретации результатов условно приняли, что диаметр задержки роста микроорганизма свыше 15 мм соответствует высокой активности, 10–15 мм — средней активность, 6–10 мм — низкой активности АТ.

Высокую антибактериальную активность АТ проявлял в отношении *P. mirabilis,* зона подавления роста микроорганизмов для которой достигала 20–28 мм. Минимальная ингибирующая концентрация АТ составляла 1.0 мг/мл, при этом выше данного значения для всех исследуемых культур микроорганизмов не наблюдалось зависимости антибактериальной активности от концентрации АТ. Средняя активность АТ наблюдалась по отношению к тест-культуре *E. coli* (12–14 мм), на рост *P. aeruginosa* АТ не оказывает никакого влияния. В качестве контроля был проведен анализ антибактериальной активности бумажных дисков, пропитанных 40%-ным раствором этанола без АТ, который не показал никакого антибактериального эффекта относительно исследуемых тест-культур, что вероятно обусловлено низким содержанием этилового спирта (40%), его диффузией и дальнейшим испарением при инкубации бумажных дисков с бактериальной культурой. Результаты исследования антимикробной активности АТ подтвердили перспективность его использования в качестве эффективного антимикробного компонента в составе раневого покрытия.

Таблица 2. Антимикробная активность АТ

Концентрация АТ, мг/мл	Зоны подавления роста, мм		
	E. coli	*P. aeruginosa*	*P. mirabilis*
0.1	0	0	0
0.5	0	0	0
1.0	14 ± 0.1	0	24 ± 0.1
4.0	12 ± 0.1	0	20 ± 0.1
5.0	12 ± 0.1	0	28 ± 0.1

Введение АТ в матрицу КАГ400 проводили в статических условиях путем погружения материала в 40%-ный водно-этанольный раствор АТ с последующим выдерживанием в течение 5 ч при 20°С. Содержание АТ в матрице материала составило 5 мг/г. Как показано на рис. 3, высвобождение основного количества включенного АТ из матрицы аэрогельного материала происходило в течение 4 ч. Максимальное высвобождение АТ составляло 50% от общего количества АТ, загруженного в матрицу материала, что обусловлено особенностями пористой структуры КАГ400 и высокой способностью к влагопоглощению.

***

Таким образом, предложен способ получения композиционных аэрогелей на основе ПЭК АЛГ-ХТЗ с включением микрочастиц $CaCO_3$ и последующей сверхкритической сушкой. Изучено влияние условий синтеза микрочастиц $CaCO_3$ на их морфологию. Установлено, что текстурные характеристики материалов не зависят от формы микрочастиц $CaCO_3$, которые выступают в качестве источника ионов Ca^{2+}, упрочняющих каркас гидрогеля, что позволяет противостоять усадочным напряжениям материала в процессе сушки и порообразователя. Все образцы характеризовались развитой мезопористой структурой и высокой удельной поверхностью 388–403 $м^2$/г. Развитая пористая структура композиционных аэрогелей определила их высокую влагопоглощающую способность (до 110 г/г) и обеспечила медленное высвобождение антимикробного компонента (атранорина) в течение 4 ч. Совокупность полученных экспериментальных данных позволяет рекомендовать полученные композиционнные аэрогели для дальнейшего изучения в качестве аппликационного материала, в том числе основы для создания высокоэффективных раневых покрытий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Исследования проведены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-23-10021).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Щипунов Ю. А., Постнова И. В.* // Коллоидный журнал. 2011. Т. 73. № . 4. С. 555–564.
2. *Кудряшова И.С., Марков П. А., Костромина Е. Ю., Еремин П. С., Рачин А. П., Гильмутдинова И. Р.* // Вестник восстановительной медицины. 2021. Т. 20. № 6. С. 84–95.
3. *Стабаева Г.С., Мусаев А. Т., Угланов Ж. Ш., Алдабергенов Е. Н., Кани А. Н., Курбатов А. В., Тажиев Т. С.* // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. Т. 10. С. 235–239.
4. *Ogaji I.J., Nep E. I., Audu-Peter J.D.* // Pharm. Anal. Acta 2012. V. 3. № 1. P. 1000146. https://doi.org/10.4172/2153–2435.1000146
5. *Prajapati S.K., Jain A., Jain A., Jain S.* // European Polymer Journal. 2019. V. 120. P. 109–191.
6. *Gorshkova N., Brovko O., Palamarchuk I., Bogolitsyn K., Ivakhnov A., Bogdanovich N. et al.* // J. Sol-Gel Science and Technology. 2020. V. 95. № 1. P. 101–108.
7. *Brovko O. S., Palamarchuk I. A., Boitsova T. A., Bogolitsyn K. G., Valchuk N. A., Chukhchin D.* G. // Macromolecular Research. 2015. V. 23. P. 1059–1067.
8. *Valchuk N.A., Brovko O. S., Palamarchuk I. A., Boitsova T. A., Bogolitsyn K. G., Ivakhnov A. D. et al.* // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2019. V. 13. № 7. P. 1121–1124.
9. *Gorshkova N. A., Brovko O. S., Palamarchuk I. A., Bogolitsyn K. G.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № . 2. P. 110–117.
10. *Кузнецова Т. А., Андрюков Б. Г., Беседнова Н. Н., Хотимченко Ю. С.* // Биология моря. 2021. Т. 47. № 1. С. 3–12.
11. *Andersen Th.* // Carbohydrate Chemistry. 2012. V. 37. P. 227–258.
12. *Smetana K. Jr.* // Biomaterials. 1993. V. 14. P. 1046–1050.
13. *Быканова О. Н., Максимова С. Н., Тарасенко Г. А.* // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2009. № 1. С. 34–36.
14. *Malgras V., Ji Q., Kamachi Y., Mori T., Shieh F. K., Wu K. C.W., Yamauchi Y.* // Bulletin of the Chemical Society of Japan. 2015. V. 88. P. 1171–1200.
15. *Trushina D. B., Bukreeva T. V., Kovalchuk M. V., Antipina M. N.* // Mater. Sci. Eng: C. 2014. V. 45. P. 644–658.
16. *Trushina D. B., Borodina T. N., Belyakov S., Antipina M. N.* // Materials Today Advances. 2022. V. 14. № 100214. https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100214
17. *Марковчин А. А.* // Современные проблемы науки и образования. 2014. Т. 6. С. 1437–1437.
18. *Lengert E. V., Trushina D. B., Soldatov M., Ermakov A. V.* // Pharmaceutics. 2022. V. 14. P. 139–146.
19. *Wang X., Zhu K. X., Zhou H. M.* // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 3042–3054.
20. *Wani S. U. D., Ali M., Mehdi S., Masoodi M. H., Zargar M. I., Shakeel F.* // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 22. № 125875. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125875
21. *Arpornmaeklong P., Jaiman N., Apinyauppatham K., Fuongfuchat A., Boonyuen S.* // Polymers. 2023. V. 15. P. 416–425.
22. *Sergeeva A., Vikulina A. S., Volodkin D.* // Micromachines. 2019. V. 10. P. 357–362.
23. *Pogodina N. V., Pavlov G. M., Bushin S. V., Mel'nikov A.B., Lysenko Y. B., Nud'ga L.A., Tsvetkov V. N.* // Polymer Science USSR. 1986. V. 28. P. 251–259.
24. *Holme H. K., Davidsen L., Kristiansen A., Smidsrod O.* // Carbohydrate Polymer. 2008. V. 73. P. 656–664.
25. *Raymond L., Morin F. G., Marchessault R. H.* // Carbohydrate Research. 1993. V. 246. № 1. P. 331–336.
26. *Nischwitz S.P., de Mattos I. B., Hofmann E., Groeber-Becker F., Funk M., Mohr G. J., Kamolz L. P.* // Burns. 2019. V. 45. P. 1336–1341.
27. *Семина Н. А., Сидоренко С. В., Резван С. П., Грудинина С. А., Страчунский Л. С., Стецюк О. У., Середа З. С.* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2004. Т. 6. № 4. С. 306–359.
28. *Fadia P., Tyagi S., Bhagat S., Nair A., Panchal P., Dave, H., Singh S.* // Biotech. 2021. V. 11. P. 1–30.
29. *Rieger J.* // Faraday Discuss. 2007. V. 136. P. 265–272.
30. *Yan F. W., Zhang S. F., Guo C. Y., Zhang X. H., Chen G. C., Yan F., Yuan G. Q.* // Crystal Research and Technology: Journal of Experimental and Industrial Crystallography. 20090. V. 44. P. 725–728.
31. *Linnikov O.D.* // Russian Chemical Reviews. 2014. V. 83. P. 343–349.
32. *Lu H., Jiang X., Wang J., Hu R.* // Frontiers in Materials. 2022. V. 9. № 1093164.
33. *Cai J., Chen X.* // RSC advances. 2018. V. 8. № 69. P. 39463–39469.
34. *Studzinska-Sroka E., Galanty A., Bylka W.* // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2017. V. 17. P. 1633–1645.

Preparation of Antibacterial Composite Aerogel for Biomedical Purposes Based on Alginate-Chitosan Complex and Calcium Carbonate

N. A. Gorshkova[a, *], O. S. Brovko[a], I. A. Palamarchuk[a], A. D. Ivahnov[a, b], N. I. Bogdanovich[b], and T. Ya. Vorob'eva[a]

[a] *N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, 163020 Russia*

[b] *Northern (Arctic) Federal University named after M. V. Lomonosov, Arkhangelsk, 163002 Russia*

**e-mail: nat.gorshkova@mail.ru*

Aerogel composites were synthesized on the basis of the sodium alginate-chitosan interpolymer complex with the inclusion of calcium carbonate microparticles and supercritical drying. It is shown that the textural characteristics of materials do not depend on the morphology of calcium carbonate particles: the specific surface area of aerogels is almost the same for all materials and amounts to 380–400 m^2/g. The developed porous structure of composites along with the polyelectrolyte nature determines their high water absorption — up to 110 g/g. To impart antimicrobial properties, the materials were impregnated with atranorin isolated from the lichen *Hypogymnia physodes*, which has a pronounced inhibitory effect on the bacterium *Proteus mirabilis*, which is the main causative agent of wound infections. The minimum suppressive concentration of atranorine is 1 mg/ml. The release of the main amount of atranorine aerosol material included in the matrix occurs within 4 hours and amounts to 50%.

Keywords: chitosan, alginate, aerogel, wound coating, lichen, chitosan, *Hypogymnia physodes*, atranorine, drug delivery, antibacterial activity

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 151–157

УДК 544.773.432:577.11

ВЫДЕЛЕНИЕ ХИТОЗАН-МЕЛАНИНОВОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ПОДМОРА МУХИ ЧЕРНАЯ ЛЬВИНКА И ПОЛУЧЕНИЕ НА ЕГО ОСНОВЕ НАНОВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ

© 2024 г. А. Ш. Хайрова[1, *], Н. А. Сажнев[2], Д. В. Коробовская[2], С. А. Лопатин[1], Н. Р. Кильдеева[2], В. П. Варламов[1]

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

[2]Российский государственный университет имени А. Н. Косыгина, Москва, 117997 Россия

*e-mail: adelya15@mail.ru

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.
После доработки 15.10.2023 г.
Принята к публикации 05.11.2023 г.

В статье приводятся результаты изучения вязкости растворов хитозан-меланинового комплекса из насекомого *Hermetia illucens* и процесса гелеобразования его в растворах в присутствии сшивающих реагентов. Из растворов хитозан-меланинового комплекса в разбавленных растворах уксусной кислоты методом бесфильерного электроформования были получены химически сшитые нановолокна. Наличие 14% меланина обеспечило возможность снижения концентрации уксусной кислоты в формовочной композиции.

Ключевые слова: хитозан, хитозан-меланиновый комплекс, электроформование, нановолокнистый матрикс.

DOI: 10.31857/S0555109924020041 **EDN:** GAWQMH

Разработка новых биоматериалов является приоритетным направлением одновременно для многих отраслей науки, что связано с возможностями применения таких материалов в разных областях в качестве раневых покрытий, биоразлагаемых упаковочных материалов, систем доставки лекарственных средств, биополимерных матриц для выращивания живых тканей и органов.

В последнее время популярность набирают материалы, изготовленные из комплексов хитозана с другими биополимерами: белками (фиброин, коллаген), пигментами (меланин) и др. Такие комплексы могут обладать новыми полезными свойствами [1].

Например, меланин может придавать пленкам из хитозана следующие свойства: защита от ультрафиолетовых лучей, антиоксидантные свойства, защита от вредных воздействий окружающей среды и радиации. Материалы на основе меланина способны регулировать температуру тела [2].

Сегодня широкое развитие получила технология переработки органических отходов с помощью личинок насекомого *Hermetia illucens* (черная львинка). В результате биоконверсии получают кормовой белок, энтожир и зоогумус. Важным преимуществом этого насекомого является его доступность для переработки на всех стадиях онтогенеза. Например, на более ранних стадиях (личинки) можно получать хитин и хитозан, а хитин- и хитозан-меланиновые комплексы — на более поздних стадиях (куколки, имаго) [3]. Важно отметить, что в конце жизненного цикла остается подмор *H.illucens* — отход при воспроизводстве личинок из маточного поголовья, который является уникальным источником для получения ковалентно связанного хитозан-меланинового комплекса с содержанием меланина около 14%. При проведении реакции деацетилирования содержание меланина в хитозан-меланиновом комплексе не снижается, что служит основным отличием черной львинки от хитозана других насекомых (например, пчел, восковой моли) [4, 5].

Электроформование известно как эффективный метод изготовления волокон субмикронного размера. Различные гибкоцепные полимеры были успешно переработаны в ультратонкие волокна толщиной до нескольких нанометров этим методом. Полученные данным методом нановолокна применяются для решения широкого спектра задач: для фильтрации высокодисперсных аэрозолей в системах очистки газовоздушных выбросов и средствах защиты органов дыхания, для обеспечения антимикробных и антивирусных свойств,

регулирования водо- и паропроницаемости, создания перевязочных средств при лечении обширных ожоговых поверхностей, длительно незаживающих ран и т.д. [6, 7]. Они используются в развитии тканевой инженерии, для систем контролируемой доставки лекарственных препаратов, при регенерации хрящевой, костной, нервной тканей, кожи, стенок кровеносных сосудов [8, 9]. Метод электроформования отличается сочетанием высокой эффективности, аппаратурной простоты, высокой гибкости, позволяющей получать волокнистые материалы с широким диапазоном свойств и размеров единичного волокна — от микро- до нановолокон [10]. Известно, что из растворов хитозана в уксусной кислоте концентрацией менее 50% не может быть получен нановолокнистый материал методом электроспиннинга [11]. С точки зрения цитосовместимости полученных нетканых материалов из хитозана, которые используются в качестве матриц для тканевой инженерии, использование концентрированной уксусной кислоты нецелесообразно. Кроме того, в концентрированных растворах кислот интенсифицируются процессы гидролиза гликозидных связей, приводящие к снижению молекулярной массы полимера. Наличие в составе хитозана черной львинки меланина может повлиять на свойства его растворов, определяющие способность к волокнообразованию в электрическом поле. Разработка новых электроформованных изделий из хитозана и комплекса хитозана с меланином позволит расширить масштабы использования этого биоразлагаемого полимера и повысит эффективность технологии по переработке отходов с помощью *H. illucens*.

Цель настоящей работы — изучение возможности получения волокнистого нетканого материала из растворов хитозан-меланинового комплекса в разбавленных растворах уксусной кислоты методом бесфильерного электроформования.

МЕТОДИКА

Материалы. Хитозан из краба с средневесовой молекулярной массой (**ММ**) 570 кДа и степенью деацетилирования 82% (ООО “Биопрогресс”, Россия). Сшивающий реагент дженипин (**Gp**) (“Xi'an Pincredit Bio-Tech Co., Ltd.”, Китай); сшивающий реагент глутаровый альдегид (**Ga**) (“Sigma Aldrich”, Германия); уксусная кислота (“х.ч.”, ледяная) ГОСТ 61–75; поливиниловый спирт (**ПВС**), ММ 50 кДа (“Qingdao Easthony Inc”, Китай).

Хитозан-меланиновый комплекс (**ХТЗ-М**) получали из подмора *H. illucens* (ООО “Энтопротэк”, Россия) по методике, описанной в работе [8], с некоторыми модификациями. Сначала проводили депротеинирование 15%-ным раствором NaOH на водяной бане в течение 2 ч при 100°С Деминерализацию осуществляли с использованием 1%-ной HCl в течение 2 ч при комнатной температуре. После каждой стадии твердый остаток отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой до нейтральных значений pH и лиофильно высушивали.

Деацетилирование ХТЗ-М проводили в 50%-ном растворе NaOH в течение 2 ч при 100°С Промывали водой осадок до нейтрального значения pH и полученную материал растворяли в 0.5%-ной CH_3COOH, фильтровали для отделения нерастворимой части и осаждали комплекс добавлением 5%-ного раствора NaOH. Суспензию выпавшего ХТЗ-М диализовали против воды и лиофильно высушивали.

Измерение молекулярно-массовых характеристик проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа S2100 (“Sykam”, Германия) в комплекте с дегазатором K-5004 (“Knauer”, Германия), колоночным термостатом Jet Stream+ (“Knauer”, Германия) и рефрактометрическим детектором K-2301 (“Knauer”, Германия). Молекулярную массу определяли при температуре 30°С с использованием колонки PSS NOVEMA Max analytical 1000 A (“PSS”, Германия) в системе 0.1 M NH_4-ацетатный буфер + 0.2 M NaCl, при значении pH 4.5 и скорости элюции 1.0 мл/мин. Контроль и анализ хроматограмм осуществляли с помощью программы “Мультихром” версия 1.6 (ЗАО “Амперсенд”, Москва). В качестве калибровочных стандартов использовали пуллуланы (ММ = 342, 1260, 6600, 9900, 23000, 48800, 113000, 200000, 348000 и 805000 Да, “PSS”, Германия).

Степень деацетилирования (**СДА**) определяли методом кондуктометрического титрования. К навеске образца (50–100 мг), предварительно высушенного до постоянного веса в микроволновой печи, добавляли 5 мл 0.1 н. HCl и 25 мл дистиллированной воды. Полученный раствор титровали 0.1 M NaOH, добавляя его порциями по 0.1 мл через каждые 30 с при постоянном перемешивании. Количество щелочи (мл), необходимое для титрования свободных аминогрупп, определяли из графика зависимости электропроводности раствора от объема щелочи, рассчитывая «плато» на двояко-изломанной кривой титрования. Расчет СДА проводили по формуле:

$$\%\text{СДА} = \frac{M_x \times V \times N}{p + (M_x - M_{xm}) \times V \times N} \times 100\% = \frac{203 \times V \times N}{p + 42 \times V \times N} \times 100\%, \quad (1)$$

где M_x — молекулярная масса звена хитина; M_{xm} — молекулярная масса звена хитозана; V — разница объемов NaOH («плато»), определяемая из графика, мл; N — нормальность NaOH; p — навеска хитозана, мг.

Исследование электронного парамагнитного резонанса проводили на ЭПР-спектрометре EMX (“Bruker”, Германия). Спектры регистрировали для сухих образцов массой 50 мг, которые помещали в цилиндрическую кварцевую кювету. Спектры ЭПР регистрировали при следующих условиях: амплитуда модуляции 1.25–3.0 Гс; диапазон развертки 50 Г; микроволновая частота 9.8 ГГц; мощность сверхвысокой частоты 0.2 мВт; постоянная времени 100 мс. Для расчета *g*-факторов и определения концентрации спинов был использован контрольный образец ультрадисперсионного алмаза № 5 (сертификат о калибровке № 905/910–2012). Количество меланина, содержащегося в хитозан-меланиновом комплексе, определяли путем сравнения с количеством чистого диоксифенилаланина (**ДОФА**)-меланина, не содержащего примесей белка. Концентрация парамагнитных центров ДОФА-меланина была определена в тех же условиях и составила 1.94×10^{18} спин/г сухого материала или препарата.

В колбу вносили навеску порошка для получения 2%-ного раствора ХТЗ-М и расчетное количество уксусной кислоты (для раствора ХТЗ-М массой 50 г необходимо 1.26 мл ледяной уксусной кислоты). После этого раствор тщательно перемешивали и оставляли на 24 ч при комнатной температуре, в течение этого времени происходило полное растворение комплекса и обезвоздушивание раствора — технологическая стадия процесса переработки волокон из растворов, необходимая для удаления пузырьков воздуха из вязких растворов с целью получения бездефектных волокнистых материалов.

Для приготовления совместных растворов из хитозан-меланинового комплекса и ПВС полимеры в соотношении 1 : 3 заливали водой и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч для полного растворения ПВС, затем в смесь добавляли ледяную уксусную кислоту (для 50 г формовочного раствора количество кислоты указано выше) для растворения хитозан-меланинового комплекса.

Приведенную вязкость определяли по среднему значению времени истечения растворов хитозана и **ХТЗ-М** в 0.2 М ацетатном буфере в капиллярном вискозиметре Убеллоде путем последовательного разбавления растворов. Расчет $\acute{\eta}_{прив}$ проводили по формуле:

$$\eta_{отн} = \tau_{р\text{-}ра}/\tau_{р\text{-}ля};\ \eta_{уд} = \eta_{отн} - 1;\ \eta_{прив} = \eta_{уд}/C, \qquad (2)$$

где $\eta_{отн}$ — относительная вязкость; $\tau_{р\text{-}ра}$ — время истечения раствора; $\tau_{р\text{-}ля}$ — время истечения растворителя; $\eta_{уд}$ — удельная вязкость; $\eta_{прив}$– приведенная вязкость; C — концентрация раствора хитозана.

Динамическую вязкость растворов измеряли на вибрационном вискозиметре SV-10 (“AMD”, Япония). После калибровки вискозиметр показывал значения с точностью до 0.1%. Изменение вязкости определялось автоматически с помощью встроенного программного обеспечения при постоянной температуре. Диапазон измерений составлял 0.3–10000 мПа·с. Частота вибрации сенсорных пластин составляла 30 Гц, стандартная пластина для образцов предполагает использование образцов объемом 10 мл.

Время гелеобразования определяли путем визуального наблюдения. К 3 г растворов ХТЗ-М или хитозана в бюксе добавляли 0.2 мл раствора глутарового альдегида или 0.62 мл раствора дженипина разной концентрации, определяемой необходимым соотношением сшивающий реагент : NH_2. Бюкс закрывали крышкой и отмечали время начала эксперимента. За время гелеобразования принимали момент, когда раствор переставал течь при переворачивании бюкса и представлял собой единую вязко-упругую массу. Нановолокнистый материал получали методом электроформования из водно-уксусных растворов хитозана или комплекса ХТЗ-М на установке Nanospider NS-Lab (“ELMARCO”, Чехия) со свободной поверхности электрода на полипропиленовую подложку из спанбонда. Для улучшения волокнообразования в композицию добавляли ПВС. Расстояние между волокнообразующим и приемным электродами составляло 140 мм, разность потенциалов изменяли от 20 до 50 кВ и выбирали как диапазон значений стабильного волокнообразования.

Изображения поверхности волокон и значения их диаметров получали при помощи атомно-силового микроскопа (**АСМ**) на основе микроконсольной системы “NtegraPrima” (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме работы кантилевера. Полученные данные подвергались обработке и сравнительному анализу в программе управления СЗМ “Nova” на базе платформы ИНТЕГРА и Solver.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были определены физико-химические характеристики полученного комплекса ХТЗ-М, выделенного из подмора *H. illucens*. Чистота полученного комплекса была подтверждена путем измерения содержания примесей: остаточный белок составлял менее 1%, липиды — менее 0.1%, зола — менее 1%. Белок определяли с помощью аминокислотного анализа, жир — экстракцией диэтиловым эфиром в аппарате Сокслета, золу — гравиметрическим способом. Полученный комплекс имел ММ 566 кДа, определенную методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии (**ВЭГПХ**). Степень деацетилирования была рассчитана с помощью кондуктометрического титрования и составила 76%. Содержание меланина в комплексе измеряли методом электронного парамагнитного резонанса (**ЭПР**). Значение составило 14%.

Электроформование является одним из наиболее технологичных методов, используемых для производства наноструктурированных материалов. Наиболее широко этот метод используется для формования волокон из растворов синтетических гибкоцепных полимеров. Для получения ультратонких волокон на основе хитозана применяют специальные приемы, такие как использование растворов в трифторуксусной кислоте или смешение хитозана с другими полимерами, такими как полиэтиленоксид, ПВС. Это связано с необходимостью разрушить межцепные взаимодействия в растворах, препятствующие формированию струи в электрическом поле. Однако даже в смеси с ПВС для получения бездефектного волокнистого материала из хитозана методом электроформования необходимо использовать в качестве растворителя 50–70%-ные растворы уксусной кислоты.

Предметом настоящего исследования стала оценка возможности получения нано- и микроволокон из растворов ХТЗ-М в разбавленной уксусной кислоте, не растворимых в воде во всем диапазоне pH, поэтому были исследованы вязкость растворов хитозана с близкой ММ, выделенного из разных источников, ее концентрационная зависимость, а также процесс гелеобразования в присутствии сшивающих реагентов.

На рис. 1 приведена зависимость $\eta_{прив}$ от концентрации *C* для хитозана и комплекса ХТЗ-М, которая определяется гидродинамическими характеристиками макромолекулы. Размер макромолекулярного клубка зависит от сродства полимера и растворителя. Характер зависимости приведенной вязкости от концентрации в исследованном диапазоне нелинейный, это связано с высокой ММ хитозана. В области более разбавленных растворов $C < 0.1\%$ характер кривых приближался к линейному, и можно видеть, что наклон кривой $\eta_{прив} = f(C)$ в случае комплекса с меланином выше, что свидетельствует о большем гидродинамическом радиусе макромолекулы по сравнению с размерами макромолекулярного клубка хитозана в том же растворителе. Это факт должен влиять на реологическое поведение формовочных растворов биополимеров.

Для изучения физико-химических свойств хитозан и комплекс хитозана и меланина растворяли в 2.5%-ной уксусной кислоте. Полученные растворы использовали для получения растворов заданной концентрации. На рис. 2 представлены результаты измерения динамической вязкости растворов, полученные на вибрационном вискозиметре, в виде среднего значения трех измерений с различной концентрацией комплекса в сравнении с концентрационной зависимостью динамической вязкости хитозана с молекулярной массой 570 кДа. Концентрация, при которой наблюдался резкий рост вязкости, соответствующая области перекрывания макромолекулярных клубков для комплекса ХТЗ-М

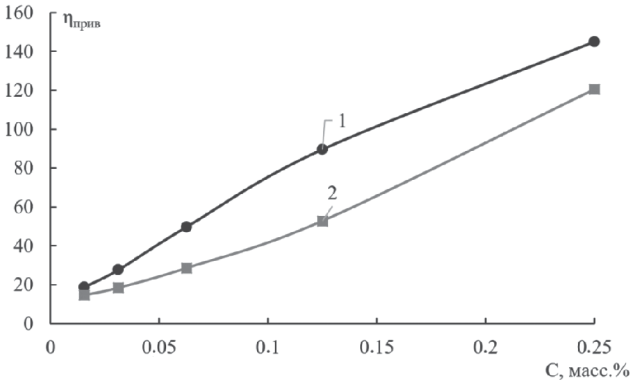

Рис. 1. Зависимость приведенной вязкости от концентрации комплекса: *1* — раствор **ХТЗ-М**, ММ 566 кДа, pH 4.3; *2* — раствор хитозана, ММ 570 кДа, pH 4.3.

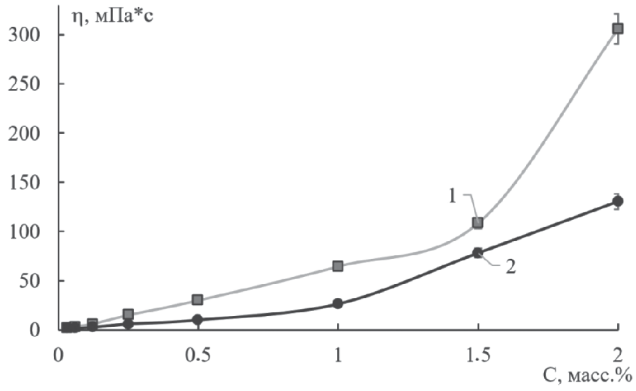

Рис. 2. Зависимость динамической вязкости от концентрации комплекса: *1* — раствор ХТЗ-М, ММ 566 кДа, pH 4.3; *2* — раствор хитозана, ММ 570 кДа, pH 4.3.

составила 1.5 масс.%, для растворов хитозана — 1 масс.%. Выше концентрации кроссовера волокнообразование возможно. Учитывая, что динамическая вязкость эквиконцентрированных растворов хитозана, содержащего меланин, выше, чем растворов хитозана с такой же ММ, можно предположить лучшую способность к волокнообразованию исследуемого хитозана из насекомого *H. illucens*.

С целью получения водонерастворимых волокнистых материалов был исследован процесс химической сшивки комплекса ХТЗ-М и хитозана традиционными для хитозана сшивающими реагентами — глутаровым альдегидом и дженипином. Зависимость времени гелеобразования 2%-ных биополимеров от содержания сшивающих реагентов (**СР**) представлена на рис. 3.

Как видно из полученных зависимостей, при одном и том же мольном соотношении CP/NH_2 в случае дженипина гелеобразование в растворах хитозана наступает быстрее, а одинаковое время гелеобразования наблюдается при меньшем содержании сшивающих реагентов (рис. 3), что может быть обусловлено стерическими затруднениями

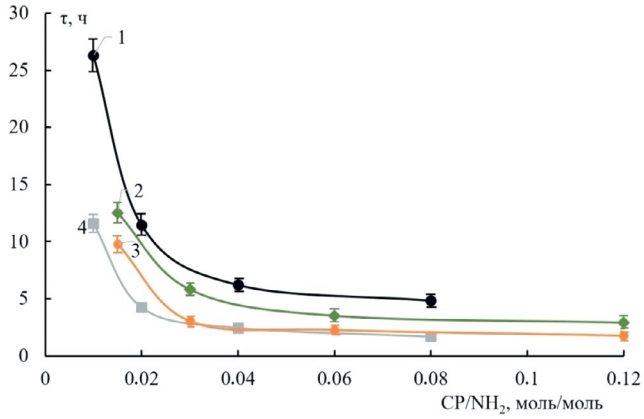

Рис. 3. Зависимость времени гелеобразования в 2%-ном растворе биополимеров (pH 4.3) от степени сшивки: *1* — хитозан, ММ 570 кДа, CP дженипин; *2* — ХТЗ-М, ММ 566 кДа, CP дженипин; *3* — хитозан, ММ 570 кДа, CP глутаровый альдегид; *4* — ХТЗ-М, ММ 566 кДа, CP глутаровый альдегид.

и особенностями строения комплекса ХТЗ-М. При использовании глутарового альдегида такая закономерность соблюдается только при низких соотношениях CP/NH_2.

Электроформование растворов полимеров может происходить при постоянных значениях вязкости и электропроводности. Для предотвращения неконтролируемого роста вязкости формовочного раствора в результате химической сшивки необходимо, чтобы процесс сшивания биополимеров завершался уже после осаждения волокна на приемном электроде. Соотношение сшивающий реагент / хитозан (0.12 моль/моль) было выбрано из полученных на рис. 3 зависимостей таким образом, чтобы подготовительные операции и процесс электроформования проходили при постоянной вязкости, а сшивка, приводящая к потере растворимости в воде, происходила уже в сформированном волокнистом материале. На основании проведенных ранее исследований [12–14] и предварительного изучения технологических характеристик формовочных растворов были выбраны составы формовочных композиций и определена возможность электроформования волокон на основе комплекса ХТЗ-М.

Составы формовочных растворов и параметры электроформования приведены в табл. 1. Сформовать волокно из хитозана, не содержащего меланин, в приведенных условиях не удалось.

Осуществить электроформование из растворов ХТЗ-М, не содержащих ПВС, также не представлялось возможным. Стабильное формование происходило из растворов, содержащих ПВС в качестве добавки, способствующей волокнообразованию. АСМ-изображение электроформованных волокон из комплекса ХТЗ-М приведено на рис. 4. Волокнистый материал состоял из наноразмерных волокон со средним диаметром 250 ± 50 нм. Такой размер шероховатостей на поверхности материала является оптимальным для прикрепления клеток и их пролиферации на волокнистой подложке. Волокна выдерживали в течение суток при постоянной влажности для завершения процесса сшивки. Полученный материал не растворялся в воде в диапазоне pH = 3.0–8.0. Таким образом, использование хитозана из насекомого *H. illucens* методом электроформования позволило снизить концентрацию уксусной кислоты с 50 до 2%, что должно способствовать снижению цитотоксичности материала при его использовании для регенерации тканевых повреждений. Более высокая волокнообразующая

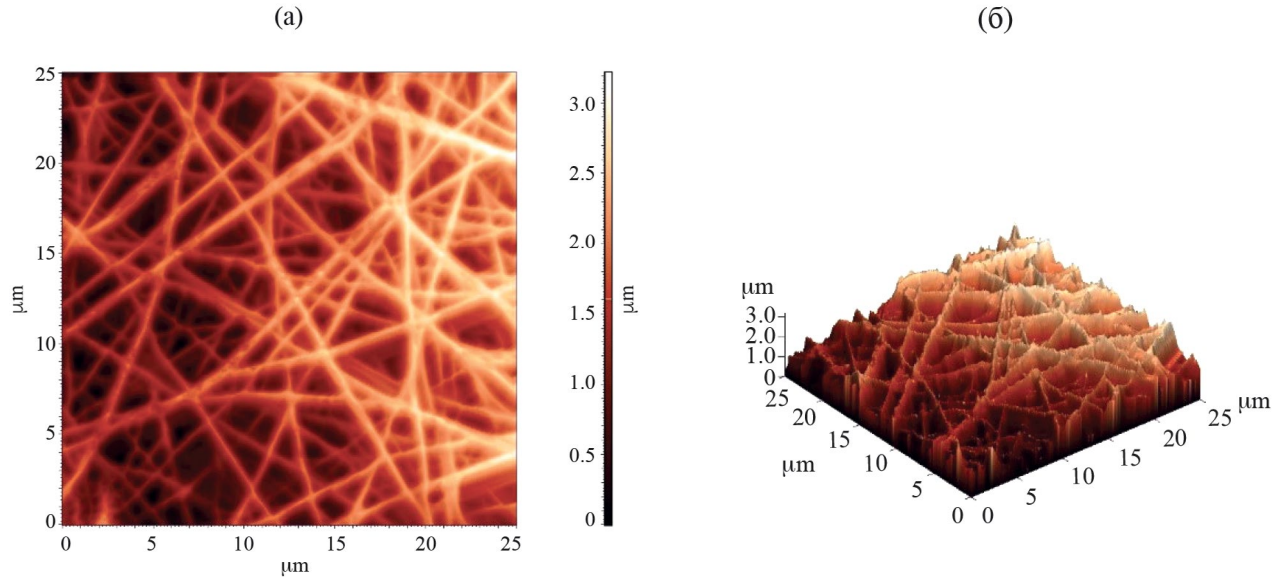

Рис. 4. АСМ-изображение электроформованных волокон из ХТЗ-М, сшитого глутаровым альдегидом (соотношение CP/NH_2 = 0.08 моль/моль, pH 5.51): а — 2D-изображение; б — 3D-изображение.

Таблица 1. Параметры электроформования волокон из 2%-ных растворов хитозан-меланинового комплекса

Состав смеси	Содержание сшивающего реагента, моль/моль	*U* наноспайдера, кВ	Характеристика электроформования	Диаметр волокон, нм
ХТЗ-М : ПВС, 1 : 3. 2%-ный раствор уксусной кислоты	Дженипин, 0.08	46.7–51.2	Стабильное	250 ± 50
ХТЗ-М : ПВС, 1 : 3. 2%-ный раствор уксусной кислоты	Глутаровый альдегид, 0.08	47.8–53.4	Стабильное	250 ± 50
Хитозан : ПВС, 1 : 3. 2%-ный раствор уксусной кислоты	Глутаровый альдегид, 0.08	35.5–55.0	Разбрызгивание раствора	–

способность ХТЗ-М по сравнению с хитозаном краба может быть вызвана наличием в составе комплекса меланина, нарушающего систему межцепных взаимодействий, что способствует преодолению сил, препятствующих образованию волокон под действием электрического поля.

Полученный волокнистый материал может быть использован в качестве раневых покрытий, а также в тканевой инженерии в качестве волокнистых матриц для роста и пролиферации живых клеток.

В работе были определены молекулярно-массовые характеристики и физико-химические свойства комплекса ХТЗ-М, выделенного из подмора насекомого *H. illucens*. Изучены концентрационные зависимости приведенной и динамической вязкости, установлено, что для комплекса ХТЗ-М концентрация, при которой происходит резкий рост вязкости, соответствует области перекрывания макромолекулярных клубков и выше, чем у хитозана с той же ММ на 1.5%.

Наличие в составе комплекса ХТЗ-М меланина приводит к изменению размеров макромолекулярного клубка по сравнению с чистым хитозаном такой же ММ, а также нарушению межмолекулярных взаимодействий, что положительно сказывается на волокнообразующей способности в процессе электроформования из смешанных растворов в 2%-ной уксусной кислоте.

Методом электроформования нановолокон из растворов ХТЗ-М в разбавленной уксусной кислоте в составе композиций с ПВС получены образцы нановолокон со средним диаметром 250 нм, устойчивые к воде в диапазоне pH 3.0–8.0.

Таким образом, результаты исследования морфологии поверхности полученного волокнистого материала из хитозан-меланинового комплекса, способность биополимера к разложению показали перспективы его использования в качестве матриц для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Данная работа выполнена в рамках государственного задания при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ghattavi S., Homaei A., Kamrani E., Saberi D., Daliri M.* // Progress in Organic Coatings. 2023. V. 174. P. 107327.
2. *Бастраков А. И., Донцов А. Е., Ушакова Н. А.* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 4. С. 77–79.
3. *Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V.* // Int. J. Biol. Macromol. 2021. № 167. P. 1319–1328.
4. *Немцев С. В., Зуева О. Ю., Хисматуллин М. Р., Албулов А. И., Варламов В. П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. № 1. С. 46–50.
5. *Останина Е. С., Лопатин С. А., Варламов В. П.* // Биотехнология. 2007. № 3. С. 38–45.
6. *Xue J., Wu T., Dai Y., Xia Y.* // Chem. Rew. 2019. № 119. P. 5298–5415.
7. *Cui J., Lu T., Li F., Wang Y., Lei J., Ma W., Huang C.* // J. Colloid Interface Sci. 2021. № 582. P. 506–514.
8. *Rahmati M., Mills D. K., Urbanska A. M., Saeb M. R., Venugopal J. R., Ramakrishna S., Mozafari M.* // Progress in Materials Science. 2021. № 117. P. 100721.
9. *Yang C., Shao Q., Han Y., Liu Q., He L., Sun Q., Ruan S.* // Applied Sciences. 2021. № 11. P. 9082.
10. *Parham S., Kharazi A. Z., Bakhsheshi-Rad H. R., Ghayour H., Ismail A. F., Nur H., Berto F.* // Materials. 2020. № 13. P. 2153.
11. *Cui C., Sun S., Wu S., Chen S., Ma J., Zhou F.* // Engineered Regeneration. 2021. V. 2. P. 82–90.
12. *Kildeeva, N., Chalykh, A., Belokon, M., Petrova, T., Matveev, V., Svidchenko et. al.* //Polymers. 2020. V. 12. № 5. P. 1086.
13. *Kildeeva N., Chalykh A., Belokon M., Petrova T., Matveev V., Svidchenko E. et. al.* // Polymer Sci., Ser. D. 2017. V. 10. P. 189–193.
14. *Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V.* // J. Physics: Conf. Ser. 2021. № 1942. P. 012003. https://doi.org/10.1088/1742-6596/1942/1/012003

Isolation of Chitosan-Melanin Complex from Black Soldier Fly Adults and Obtaining Nanofibrous Materials Based on It

A. Sh. Khayrova[a], *, N. A. Sazhnev[b], D. V. Korobovskaya[b], S. A. Lopatin[a], N. R. Kildeeva[b], and V. P. Varlamov[a]

[a] *Bioengineering Institute, Federal research centre "Fundamentals of biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

[b] *The Kosygin Russian State University, Moscow, 117997 Russia*

**e-mail: adelya15@mail.ru*

The article presents the results of studying the viscosity of chitosan-melanin complex solutions from the larvae of the insect *Hermetia illucens* and the process of gelation in these solutions in the presence of crosslinking reagents. Chemically cross-linked nanofibers were obtained from solutions of the chitosan-melanin complex in dilute solutions of acetic acid by the method of spinneretless electrospinning. The presence of 14% melanin made it possible to reduce the concentration of acetic acid in the spinning composition.

Keywords: chitosan, chitosan-melanin complex, electrospinning, nanofiber matrix

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 158–166

УДК 57.012.5

ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА НА СПОСОБНОСТЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С КЛЕТКАМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

© 2024 г. В. Н. Давыдова[1, *], А. В. Володько[1], В. И. Горбач[1], С. В. Чусовитина[2], Т. Ф. Соловьева[1], И. М. Ермак[1]

[1]*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, Владивосток, 690022 Россия*

[2]*Институт автоматики и процессов управления, Дальневосточное отделение РАН, Владивосток, 690041 Россия*

**e-mail: vikdavidova@yandex.ru*

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.
После доработки 03.11.2023 г.
Принята к публикации 05.11.2023 г.

Получены комплексы липополисахарида (**ЛПС**) бактерии *Escherichia coli* с хитозаном (**ХН**) с молекулярной массой 5 кДа и изучена их надмолекулярная организация. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что в процессе образования комплексов происходит переход от мицеллярной структуры исходного ЛПС к линейным сетчатым структурам, равномерно распределенным по поверхности слюды. Изучена стабильность комплексов ЛПС-ХН различной стехиометрии в биологических средах в присутствии белков сыворотки. Показано, что комплексы с соотношением ЛПС-ХН 1 : 1 в присутствии сывороточных белков теряли свой поверхностный заряд и имели склонность к агрегации, комплексы с максимальным насыщением ХН (1 : 5) в данных условиях не агрегировали и сохраняли свой поверхностный заряд. Исследовано влияние ХН различной молекулярной массы на способность ЛПС взаимодействовать с нейтрофилами цельной крови человека. Показано, что комплексы ЛПС-ХН связывались с нейтрофилами и поступили внутрь клетки, причем эта способность усиливалась в присутствии белков сыворотки. Хитозан обладал способностью подавлять синтез провоспалительного цитокина ФНО-α, индуцированного ЛПС, не только в составе комплекса, но и при предварительной обработке клеток поликатионом.

Ключевые слова: липополисахарид, эндотоксин, хитозан, надмолекулярная организация, цитокин-индуцирующая активность

DOI: 10.31857/S0555109924020051 **EDN:** GAWNZC

Проблема терапии инфекционных заболеваний, вызванных бактериями, не теряет своей актуальности. В последнее время она осложняется появлением новых антибиотикорезистентных штаммов со множественной лекарственной устойчивостью. Это приводит к тому, что антибиотики теряют свою эффективность, в связи с чем продолжается поиск антибактериальных веществ, в основном природного происхождения, способных нейтрализовать действие патогенных микроорганизмов.

Природный полисахарид хитозан известен своей антибактериальной активностью и используется в составе ранозаживляющих средств, способных предотвращать развитие патогенной микрофлоры [1. 2]. В основе антибактериального действия хитозана лежит его способность взаимодействовать с компонентами мембраны бактерий. В случае грамотрицательных бактерий таким компонентом является липополисахарид (эндотоксин, **ЛПС**) [3]. ЛПС высоко консервативен почти у всех грамотрицательных бактерий и присутствует повсеместно в окружающей среде. При попадании в организм распознается клетками иммунной системы (в первую очередь макрофагами) и запускает воспалительную реакцию, направленную на подавление инфекции, а при остром течении инфекции может вызывать токсические проявления, от повышения температуры до септического шока [4].

ЛПС является амфифильной молекулой, состоящей из трех основных структурных компонентов – липида А, олигосахарида кора и О-специфических полисахаридных цепей. Липид А – дисахарид глюкозамина, ацилированный остатками жирных кислот, отвечает за токсические свойства ЛПС. Структура и состав О-полисахаридных цепей уникальна для каждого штамма бактерий и отвечает за иммуногенные свойства ЛПС [4].

Одним из ключевых рецепторов, опосредующих эффекты ЛПС при его контакте с иммунной

системой организма, является толл-подобный рецептор (**TLR-4**). В течение многих лет считалось, что рецепторный комплекс CD14/TLR4/MD2, присутствующий на макрофагах и многих других клетках организма, связывает ЛПС и несет полную ответственность за клеточный ответ, индуцированный эндотоксином [5]. Проведенные исследования [6, 7] показали, что с рецептором связывается единичная молекула ЛПС, которая высвобождается из агрегатов при участии ряда сопутствующих сывороточных белков, ключевыми из которых являются CD14 и ЛПС-связывающий белок. Однако в начале 2000 гг. было показано, что биологически активным может также являться агрегат эндотоксина [8], который способен интернализироваться внутрь клетки [9]. После интернализации ЛПС может перемещаться во внутриклеточные компартменты, где часть липида А частично разрушется, что сопровождается модификацией его биологической активности [10]. Механизм внутриклеточного узнавания ЛПС осуществляется с участием каспазы-4/5 у людей и каспазы-11 у мышей, которые распознают внутриклеточный ЛПС в цитоплазме клеток и стимулируют выработку провоспалительных цитокинов и воспалительную гибель клеток, называемую пироптозом [10].

Ранее были детально исследованы особенности взаимодействия ЛПС грамотрицательных бактерий с хитозаном [3]. Показано, что данный полисахарид способен связываться с эндотоксином и снижать его токсические свойства: острую токсичность и цитокин-индуцирующую активность в отношении провоспалительных цитокинов. Этот процесс зависел от структуры ЛПС, степени ацилирования липида А, длины О-специфического полисахарида, а также от молекулярной массы хитозана. Было показано [3, 11], что изменение надмолекулярной организации ЛПС при образовании комплекса с хитозаном с молекулярной массой 110 кДа приводило к изменению некоторых биологических свойств эндотоксина в составе его комплексов. При использовании клеток почки эмбриона человека (клетки HEK 293), котрансфицированных рецепторами TLR-4 и MD2, было установлено, что хитозан не блокировал связывание рецептора TLR4 с ЛПС и передачу сигнала ЛПС в клетке [12]. В связи с открытием альтернативного пути активации клеток ЛПС [10] можно предположить, что снижение цитокин-индуцирующей активности ЛПС обусловлено реализацией второго сигнального пути ответа на ЛПС, связанного с участием каспаз. При этом образование комплекса с хитозаном может влиять на способность ЛПС связываться с клетками и на его последующую интернализацию за счет модификации поверхностного заряда его молекулы и/или изменения надмолекулярной организации эндотоксина в результате формирования комплекса.

Цель работы – проверка выдвинутой гипотезы об участии хитозана в процессах ингибирования ЛПС-индуцированного синтеза провоспалительных цитокинов.

МЕТОДИКА

Образец хитозана (**ХН**) с молекулярной массой 110 кДа и степенью N-ацетилирования 4% был получен щелочной обработкой хитина краба по методике [13]. Степень N-ацетилирования образца хитозана рассчитывали по данным ИК-спектроскопии [14]. Для работы использовали солевую форму ХН. Для этого полисахарид (200 мг) растворяли в 20 мл дистиллированной воды при подкислении 1н HCl до его полного растворения. pH полученного раствора доводили до 5.5 добавлением NaOH и диализовали против дистиллированной воды. Солевую форму ХН лиофилизовали и использовали для дальнейшей работы. Методом деполимеризации с использованием перекиси водорода [15] был получен хитозан с низкой молекулярной массой, которая составила 5 кДа.

В работе также использовали коммерческий препарат ЛПС *E. coli* O55:B5 (“Sigma”, США). Образец ЛПС, меченый флуоресцеин-5-изотиоцианатом (**ФИТЦ-ЛПС**), получен по методике, опубликованной ранее [16].

Определение молекулярной массы. Молекулярную массу ХН рассчитывали по уравнению Марка–Хаувинка–Куна:

$$|\eta| = K_м M^{\alpha},$$

где $|\eta|$ – характеристическая вязкость, M – молекулярная масса, $K_м$ и α – эмпирические константы, значения которых взяты из работы [17]. Вязкость растворов ХН в 0.1 М ацетатном буфере, pH 5.0, содержащем 0.2 М NaCl, определяли в модифицированном вискозиметре Убеллоде (СКБ “Пущино”, Россия) с диаметром капилляра 0.3 мм при 25°C (точность измерения ±0.1 с). Значения характеристической вязкости рассчитывали двойной графической экстраполяцией зависимости $\ln\eta_{отн}/C$ от бесконечного разбавления.

Молекулярную массу низкомолекулярного производного определяли по методу, основанному на реакции восстанавливающих сахаров с ферроцианидом [18].

Получение комплексов ЛПС : хитозан. ЛПС (1 мг) и ХН (7–1.4 мг) растворяли раздельно в 5 мл апирогенной деионизированной воды. Растворы выдерживали в течение 48 ч при 37°C, затем смешивали равные аликвоты ЛПС и ХН и инкубировали 18 ч при 37°C. Перед приготовлением комплексов растворы ЛПС и ХН фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм “Millex GS” (“Millipore”, Ирландия).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). ЛПС растворяли в дистиллированной деионизированной воде в концентрации 0.1 мг/мл, образцы ХН – в концентрации 0.01, 0.1 или 0.5 мг/мл. Аликвоты (12 мкл) водных растворов каждого комплекса и их исходных компонентов наносили на свежесколотую слюду и сушили при 37°С в течение 24 ч или при 70°С в течение 30 с (для ЛПС). Морфологию ХН, ЛПС и их комплексов изучали на атомном силовом микроскопе Solver P47 (“NT-MDT”, Россия) в режиме постукивающего контакта с использованием иглы радиусом 10 нм.

Динамическое рассеяние света (ДРС) и электрокинетические свойства комплексов ЛПС : ХН. Размеры и ζ-потенциал ЛПС, ХН и их комплексов в растворе определяли с использованием системы ZetaSizer NanoZS (“Malvern”, Великобритания), работающей при 633 нм. Измерения проводили при 25°С. Гидродинамический радиус частиц рассчитывали автоматически с помощью программного обеспечения прибора, основанного на анализе автокорреляционной функции. ζ-потенциал рассчитывали по экспериментально определенной электрокинетической подвижности с использованием уравнения Генри [19].

Лейкоциты. В работе использовали лейкоциты венозной крови пяти здоровых доноров, которая была получена в клинических условиях согласно ГОСТ р 53079.4-2008. Все доноры оформили добровольное информированное согласие на участие в проводимых исследованиях. Лейкоциты отделяли от венозной крови путем лизиса эритроцитов в растворе, содержащем 0.15 М NH_4Cl, 10 мМ $NaHCO_3$ и 0.1 мМ ЭДТА в течение 10 мин [20]. Фракцию лейкоцитов дважды промывали, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (**ФСБ**) и доводили до концентрации ≈ 107 кл./мл.

Взаимодействие ЛПС с нейтрофилами. Количество ФИТЦ-ЛПС, связавшегося с клеткой, определяли с помощью проточной цитометрии. В 96-луночный планшет (“Costar”, США) вносили суспензию лейкоцитов (100 мкл) в ФБР или в ФБР с добавлением пула сыворотки (20 мкл) доноров и инкубировали в течение 1 ч с образцами. Клетки отделяли от планшета, выдерживая на льду (10 мин), и немедленно анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США). Идентификацию популяций клеток проводили на основании данных прямого и бокового рассеяния света.

Для определения количества ФИТЦ-ЛПС, поглощенного нейтрофилом, к суспезии клеток добавляли 10 мкл раствора трипанового синего для гашения флуоресценции ФИТЦ-ЛПС, оставшегося на поверхности клетки.

Продукция ФНО-α. Венозную кровь помещали в стерильные пробирки на 5 мл, содержащие 150IU гепарина (“Sigma”, США), разбавляли 1 : 5 в стерильной среде 199 (“Sigma”, США), содержащей 300 мг/л L-глютамина (“Sigma”, США) и 50 мкг/мл гентамицина (“Белмедпрепараты”, Белоруссия). Разбавленную кровь (0.1 мл) переносили в стерильный 96-луночный планшет (“Corning Costar”, США) и инкубировали с растворами (0.1 мл) исследуемых соединений (37°С, 5% CO_2). Для определения ингибирующего действия хитозана на синтез цитокинов, индуцированный ЛПС, в каждую лунку, содержащую 0.1 мл цельной крови, разбавленной как описано выше, вносили раствор ХН (0.1 мг/мл) и через 10 мин раствор ЛПС *E. coli* O55:B5 (“Sigma”, США) до конечной концентрации эндотоксина, равной 100 нг/мл. Через 24 ч супернатанты собирали и определяли содержание ФНО-α с помощью специфической тест-системы (ООО “Цитокин”, Россия).

Статистический анализ. Все данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика комплексов. В работе использовали ХН со степенью N-дезацетилирования 96% и молекулярной массой 110 кДа (**ХН-110**) и его низкомолекулярное производное с молекулярной массой 5 кДа (**ХН-5**).

Характеристика надмолекулярной организации комплексов ЛПС *E. coli* с ХН-110 была проведена ранее [11], и наиболее выраженная модификация ЛПС *E. coli* в результате его связывания с хитозаном наблюдалась для комплекса ЛПС-ХН-110 при весовом соотношении 1 : 1.

В настоящей работе методом АСМ была исследована морфология комплексов. Наряду с указанным выше комплексом были получены комплексы ЛПС *E. coli* с ХН-5 при весовом соотношении 1 : 5, что соответствует максимальному насыщению ЛПС хитозаном. На рис. 1 представлены сканы исходных компонентов ЛПС (0.1 мг/мл) и ХН-5. Согласно полученным изображениям, ЛПС образует мицеллоподобные структуры (около 10 нм), которые собираются в более крупные образования, что типично для амфифильных полимеров и было отмечено ранее [11].

Данные АСМ выявили зависимость морфологии ХН-5 от его концентрации (0.1 и 0.5 мг/мл). При концентрации 0.1 мг/мл (рис. 1б) ХН-5 распределялся на гидрофильной отрицательно заряженной поверхности слюды неравномерно (средняя шероховатость поверхности 2.1 нм), имея склонность к формированию островковых структур высотой 5 нм, состоящих из частиц округлой формы. При концентрации 0.5 мг/мл на сканах (рис. 1в) для ХН-5 были зарегистрированы частицы округлой формы, объединенные в плотно

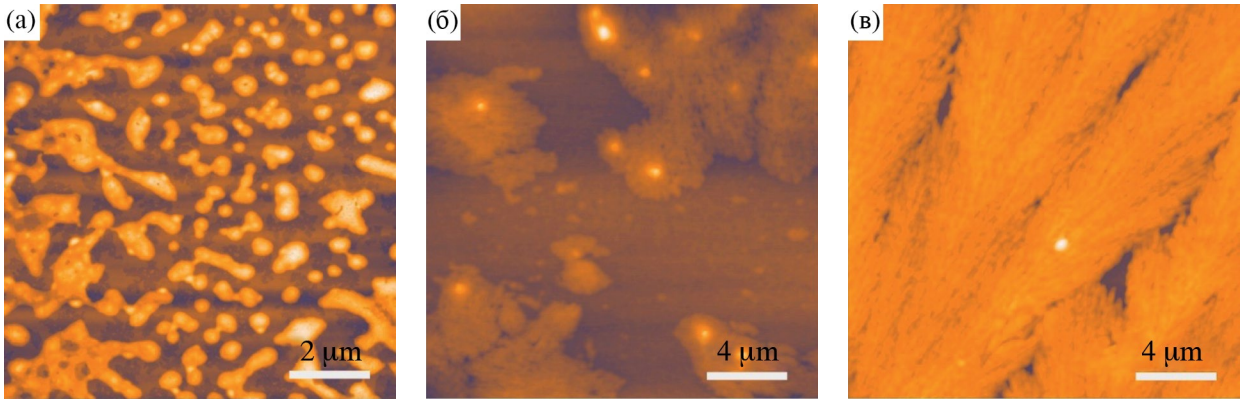

Рис. 1. АСМ-изображения исходных образцов: а – ЛПС (0.1 мг/мл); б – ХН-5 (0.1 мг/мл); в – ХН-5 (0.5 мг/мл).

упакованные линейные структуры. Похожие структуры были также характерны и для ХН-110 [11, 21].

Комплекс ЛПС : ХН-5 1 : 1 (рис 2а) формировал ярко выраженную сетчатую структуру с высотой стенок около 20 мм и шириной от 88 до 146 нм. В отдельных местах на поверхности сетки наблюдались островки неправильной формы с четкой огранкой, что обычно является признаком кристаллического вещества и может быть следствием присутствия остатков солей в образце.

Для комплекса с максимальным содержанием хитозана (ЛПС : ХН-5 1 : 5) (рис. 2б) характерно более равномерное и плотное распределение образца по поверхности слюды с высотой слоя до 12 нм с формированием хаотически расположенных пор.

Ранее [11] методом АСМ было зафиксировано изменение надмолекулярной структуры ЛПС при образовании комплекса с ХН-110. При весовом соотношении компонентов 1 : 1 формировались линейные червеобразные структуры. При увеличении содержания хитозана в комплексе регистрировали структуры, равномерно распределенные по поверхности слюды, с присутствием более крупных агрегатов. Согласно характеру распределения частиц по поверхности слюды было высказано предположение о поверхностной локализации хитозана в комплексе ЛПС-ХН-110 [11]. В данной работе была зафиксирована трансформация мицеллярной структуры исходного ЛПС в результате его взаимодействия с ХН-5. При этом линейные сетчатые структуры, равномерно распределенные по поверхности слюды, в случае комплекса ЛПС : ХН-5 1 : 1 с увеличением содержания хитозана в комплексе ЛПС : ХН-5 1 : 5 переходили в более плотно упакованные агрегаты (рис. 2).

Методом ДРС были определены размер и поверхностный заряд (ζ-потенциал) комплексов ЛПС-ХН-5 (табл. 1).

Согласно результатам табл. 1, комплексы представляли собой положительно заряженные частицы с невысоким значением поверхностного потенциала, которое слабо зависело от содержания ХН-5 в комплексе. Размер комплексов превышал размер исходных агрегатов ЛПС. При этом комплекс ЛПС : ХН-5 1 : 5 имел мономодальное распределение частиц, тогда как при соотношении 1 : 1 в/в формировалось две популяции частиц с размерами 140 и 533 нм. С учетом низкого значения

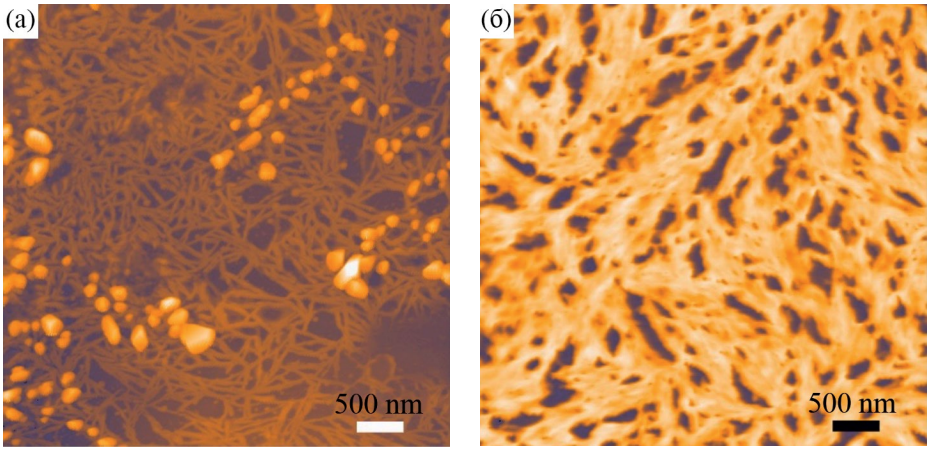

Рис. 2. АСМ-изображения комплексов ЛПС : ХН-5 – 1 : 1 (а) и 1 : 5 (б).

Таблица 1. Размер и поверхностный заряд ЛПС и его комплексов с хитозанами

Образец	ζ-потенциал, мВ	Размер, нм	
		Гидродинамический диаметр	Содержание, %
ЛПС	–33.5 ± 6.4	132.5 ± 0.3	100
ХН-5	+37.0 ± 7.2	-	-
ЛПС : ХН-5 1 : 1	+4.1 ± 0.6	140.1 ± 14.5	49
		533.3 ± 95.1	51
ЛПС : ХН-5 1 : 5	+7.8 ± 1.7	224.4 ± 49.7	100

ζ-потенциала, которое не способствует стабилизации комплекса, можно предположить, что частицы размером 533 нм формировались путем агрегации более мелких частиц (140 нм). Это согласуется с данными АСМ (рис. 2) и подтверждает наше предположение о том, что комплексы ЛПС : ХН-5 1 : 1 и 1 : 5 имеют сходную надмолекулярную структуру. Ранее было установлено, что комплексы ЛПС-ХН-110 имели высокое значение ζ-потенциала, величина которого увеличивалась с повышением содержания ХН-110 в комплексе, что позволило высказать предположение о поверхностной локализации поликатиона в комплексе с ЛПС.

Полученное в настоящей работе невысокое значение поверхностного потенциала для комплексов ХН-5 может быть обусловлено большей гибкостью и подвижностью молекул олигохитозана, что способствовало его проникновению в агрегаты ЛПС. В этом случае, вероятно, О-специфические полисахаридные цепи эндотоксина экранируют заряд ХН-5, молекулы которого не локализовались на поверхности ЛПС, в отличие от ХН-110, а находились внутри агрегатов эндотоксина.

Влияние белков сыворотки на стабильность комплексов. Для оценки стабильности полученных комплексов были изучены их физико-химические свойства в присутствии белков сыворотки крови человека, что позволило рассматривать формирование таких комплексов в системах, моделирующих живой организм.

В предыдущем разделе мы отметили разный характер взаимодействия ХН с ЛПС, который зависит от молекулярной массы поликатиона. Согласно предыдущим результатам, ХН-110 локализуется на поверхности агрегатов эндотоксина [11], тогда как его олигосахарид (ХН-5) способен проникать внутрь этих агрегатов. Такое разное поведение при образовании комплексов ХН-100 и его олигосахарида с ЛПС может обусловливать и их особенности взаимодействия с белками сыворотки. Для оценки этого в последующей работе мы использовали комплексы ЛПС с хитозанами разной молекулярной массы.

Действие белков сыворотки на комплексы определяли методами ДРС по изменению поверхностного заряда и размера частиц как исходных компонентов, так и полученных на их основе комплексов (табл. 2).

Сывороточные белки представляли собой полидисперсную популяцию частиц с небольшими размерами (согласно Z-среднему) с поверхностным потенциалом –28.8 мВ.

В присутствии белков сыворотки ХН-110 и ХН-5 сохраняли положительное значение поверхностного потенциала, но, согласно данным куммулятного анализа, сыворотка вызывала существенную дезагрегацию частиц поликатиона. В присутствии белков сыворотки ЛПС также формировал более мелкие агрегаты.

Согласно данным табл. 2, ярко выраженное влияние сывороточных белков наблюдалось в случае комплексов, полученных при весовом соотношении

Таблица 2. Размер и поверхностный заряд ЛПС и его комплексов с хитозанами в присутствии белков сыворотки крови человека

Образец	ζ-потенциал, мВ		Размер (Z-средний), нм	
	вода	сыворотка	вода	сыворотка
Белки сыворотки	–28.8 ± 2.1		47.1 ± 1.9	
Е-ЛПС	–33.5 ± 6.4	–28.2 ± 2.3	134.4 ± 2.5	87.0 ± 7.0
ХН-110	+45.1 ± 2.2	+40.3 ± 3.2	822.0 ± 41.4	99.7 ± 5.2
ЛПС : ХН-110 1 : 1	+23.1 ± 1.1	–1.3 ± 0.1	221.7 ± 3.9	2265.4 ± 523.1
ЛПС : ХН-110 1 : 7	+39.0 ± 1.2	+35.1 ± 0.5	281.6 ± 0.5	158.1 ± 3.5
ХН-5	+37.0 ± 7.2	+25.0 ± 0.7	233.1 ± 11.0	62.8 ± 1.0
ЛПС : ХН-5 1 : 1	+4.1 ± 0.6	–3.7 ± 0.1	231.5 ± 4.3	1009 ± 124.5
ЛПС : ХН-5 1 : 5	+7.8 ± 1.7	+7.5 ± 0.1	220.2 ± 10.6	110.6 ± 2.7

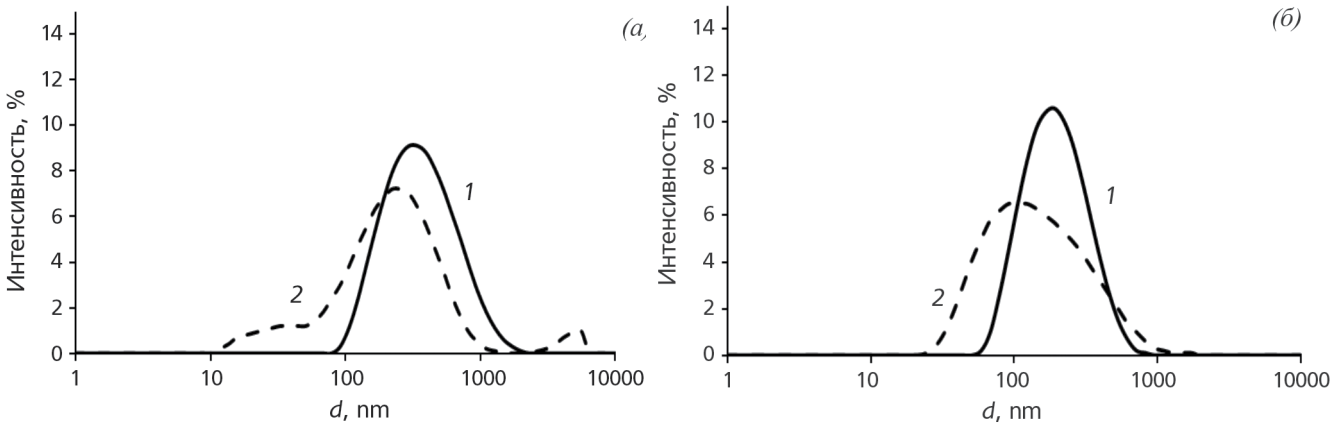

Рис. 3. Распределение по размерам частиц комплекса ЛПС : ХН-110 1 : 7 (а) и ЛПС : ХН-5 1 : 5 (б) в воде (*1*) и в присутствии сыворотки (*2*).

компонентов ЛПС : ХН 1 : 1 независимо от молекулярной массы поликатиона. В присутствии белков сыворотки эти комплексы формировали крупные агрегаты (1009 и 2265 нм для ХН-5 и ХН-110 соответственно) с невысоким отрицательным значением поверхностного заряда. В этом случае мы наблюдаем агрегацию частиц комплекса и образование осадка для комплекса ЛПС : ХН-110. В присутствии сыворотки в систему происходила перезарядка частиц комплексов ЛПС : ХН 1 : 1, оба комплекса приобретали низкое отрицательное значение поверхностного потенциала недостаточное для предотвращения их агрегации. В данном случае, вероятно, на поверхности комплекса образовывалась так называемая белковая корона, что характерно для наночастиц при контакте с белками сыворотки [22]. При добавлении сыворотки к комплексам с высоким содержанием поликатиона (1 : 7 и 1 : 5 для ХН-110 и ХН-5 соответственно) их поверхностный потенциал значительно не изменялся. Значение Z-среднего указывало на разукрупнение частиц, однако достоверно это утверждать нельзя, поскольку при анализе кумулянтов учитывалась вся совокупность частиц, и падение размеров могло быть связно просто с присутствием мелких частиц белков сыворотки. Данные распределительного анализа, представленные на рис. 3, свидетельствовали о том, что характер распределения по размерам данных комплексов изменялся незначительно. Принимая во внимание значения их ζ-потенциала, можно предположить, что комплексы с максимальным насыщением ЛПС хитозаном остаются стабильными в присутствии сыворотки крови человека.

Взаимодействие ЛПС и его комплексов с нейтрофилами. Основными мишенями ЛПС являются фагоцитирующие клетки иммунной системы, включая тканевые макрофаги, периферические моноциты, нейтрофилы и дендритные клетки. Для того чтобы ЛПС вызывал прямые провоспалительные или иммунологические реакции, он должен сначала распознаваться этими фагоцитирующими клетками в сочетании со специфическими механизмами клеточного прикрепления или интернализации [5, 7, 23]. Общий механизм взаимодействия любых молекул и супрамолекулярных комплексов осуществляется в несколько этапов: адгезия на мембране, внутриклеточный захват посредством различных механизмов, транспортировка внутри клетки в органеллы, в которых происходит последующая деградация, экзоцитоз во внеклеточное пространство [24] или поступление в цитозоль [10].

В настоящей работе изучено взаимодействие ЛПС и ЛПС-ХН комплексов с клетками иммунной системы нейтрофилами. Для этого был получен флуоресцентно-меченный ФИТЦ. Оценку взаимодействия ФИТЦ-ЛПС с нейтрофилами проводили как на интактных клетках, так и на клетках предварительно инкубированных с ХН. Для тушения внеклеточной флуоресценции непоглощенного ФИТЦ-ЛПС использовали раствор трипанового синего. Этот краситель не проникает в неповрежденные нейтрофилы, что позволяет определить количество поглощенного нейтрофилами ФИТЦ-ЛПС.

На рис. 4 представлены результаты взаимодействия с клеткой ФИТЦ-ЛПС, его комплексов ХН как в культуральной среде, так и в среде, содержащей белки сыворотки крови человека.

Согласно полученным данным, ФИТЦ-ЛПС в составе комплекса с ХН-110 лучше взаимодействовал с клеткой, чем исходный эндотоксин. Количество ЛПС в комплексе, связанного с нейтрофилом, увеличивалось с увеличением содержания ХН-110 (рис. 4а). В отсутствие белков сыворотки комплексы гораздо хуже поглощались клеткой, чем свободный эндотоксин и основная часть ЛПС оставалась на поверхности клетки. Предварительная обработка клеток 25 мкг ХН-110 (соотношение ЛПС : ХН 1 : 1) практически не влияла на связывание и поступление ЛПС внутрь клетки. При увеличении концентрации ХН-110 до 175 мкг/мл (соотношение

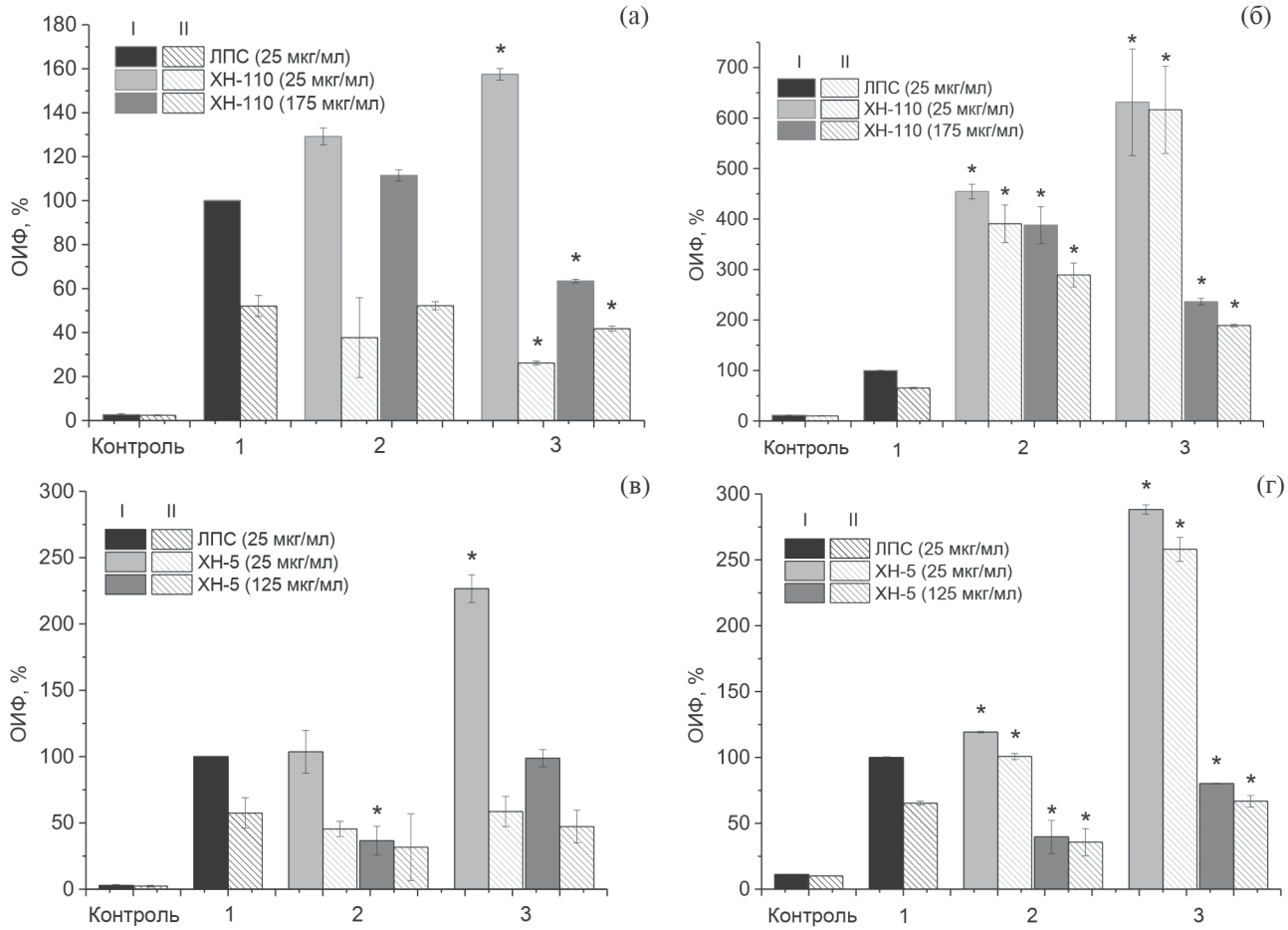

Рис. 4. Взаимодействие ЛПС *E. coli* (1), комплексов ЛПС : ХН с нейтрофилами крови человека (2) и ЛПС с нейтрофилами, преинкубированными с ХН (3): а, в – инкубация нейтрофилов с образцами (30 мин); б, г – то же с добавлением сыворотки крови человека (30 мин). I – суммарная флуоресценция ФИТЦ-ЛПС (ОИФ), прореагировавшего с нейтрофилом; II – флуоресценция ФИТЦ-ЛПС, поглощенного нейтрофилом. ОИФ ФИТЦ-ЛПС (1), прореагировавшего с нейтрофилами, принимали за 100%. (*Разница между образцами 2, 3 и ЛПС статистически достоверна, $p < 0.05$).

ЛПС : ХН 1 : 7) количество, прореагировавшего с клеткой ФИТЦ-ЛПС, снижалось в 1.3 раза.

Добавление в исследуемую систему сыворотки крови человека значительно повышало количество связанного с клеткой ЛПС. В этом случае интенсивность флуоресценции нейтрофилов, обработанных комплексами ЛПС : ХН-110 1 : 1 и 1 : 5 была в 3.5–4.0 раза выше, чем в системе не содержащей белки сыворотки (рис. 4а, б). При этом основная часть ЛПС в составе комплекса поступала внутрь нейтрофила. Вероятно, в данном случае белки сыворотки проявляли свою опсонизирующую способность, стимулируя фагоцитоз частиц. Предварительная обработка клеток ХН-110 в системе, содержащей сывороточные белки, также стимулировала прикрепление и последующее проникновение ФИТЦ-ЛПС в клетку (рис. 4б).

При взаимодействии с нейтрофилами комплексов ЛПС : ХН-5 увеличение интенсивности флуоресценции наблюдалось только для комплекса с высоким содержанием ХН-5 (1 : 5) (рис. 4в). При предварительной обработке клеток ХН-5 (25 мкг/мл) ингибировал прикрепление ФИТЦ-ЛПС к нейтрофилам, а при увеличении концентрации ХН-5 до 125 мкг/мл, в отличие от ХН-110, ингибирования связывания ЛПС с клеткой не наблюдалось. Внесение в среду белков сыворотки в случае ЛПС : ХН-5 (рис. 4г) так же, как и в случае комплексов с ХН-110, способствовало их интернализации в клетку. Однако количество ФИТЦ-ЛПС в составе комплекса, прореагировавшего с клеткой, было меньше, чем в случае комплексов с ХН-110. Необходимо отметить ингибирующее действие при предварительной обработке клеток ХН-5, в отличие от ХН-110, сохранялось и в присутствии белков сыворотки.

Цитокин-индуцирующая активность. Хорошо известно, что ЛПС обладает способностью стимулировать синтез цитокинов в клетках макроорганизма. При высоких концентрациях эндотоксина в кровотоке

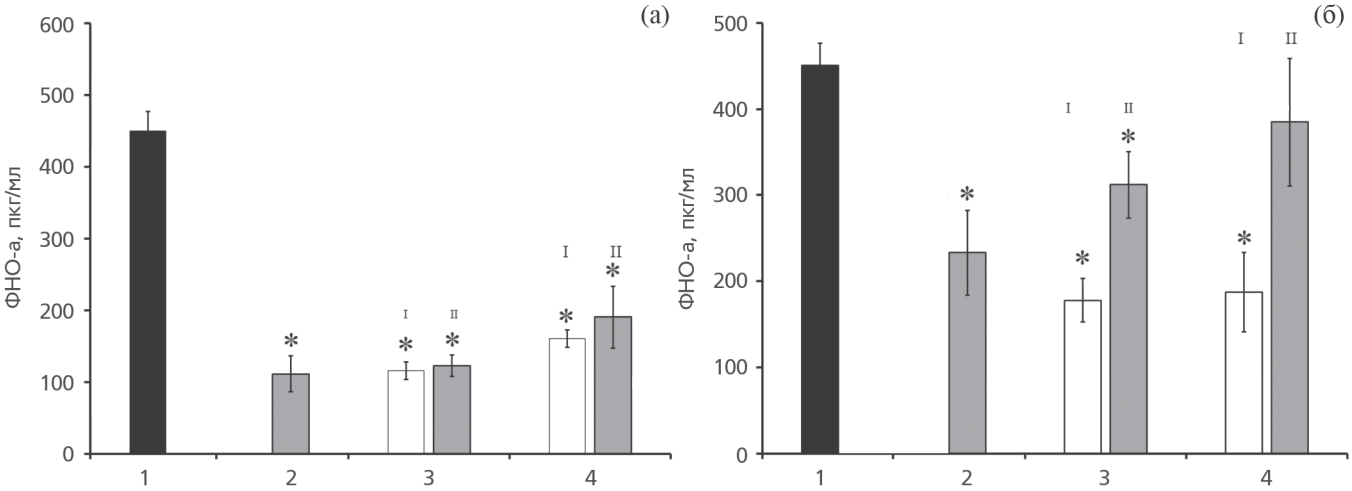

Рис. 5. Продукция ФНО-α клетками цельной крови человека, стимулированная ЛПС (1), ХН (2), комплексами ЛПС : ХН (3) и ЛПС после преинкубации (10 мин) клеток с ХН (4): а – ХН-110; б – ХН-5 (концентрация: ЛПС – 100 нг/мл, ХН – 100 нг/мл (I), ХН-110 – 700 нг/мл, ХН-5 – 500 нг/мл (II). (*Разница между образцами и ЛПС статистически достоверна, $p < 0.05$).

наблюдается гиперактивация иммунной системы, сопровождаемая тяжелыми осложнениями [6].

На рис. 5 представлены результаты изучения влияния ХН на способность ЛПС индуцировать синтез провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) в клетках цельной крови человека. Из всех исследованных образцов наибольшей активностью обладал ЛПС. Хитозан имел более низкую (в 2–4 раза) активность, чем ЛПС, при этом ХН-5 почти в 2 раза активнее ХН-110. Способность ЛПС стимулировать синтез ФНО в комплексах с ХН-110 снижалась на 75%, независимо от соотношения компонентов. ХН-110 проявлял ингибирующую активность как в составе комплекса, так и при предварительной обработке клеток. ХН-5 менее эффективно снижал цитокин-индуцирующую активность ЛПС – статистически достоверное снижение содержания ФНО-α наблюдалось только при соотношении ЛПС : ХН-5 1 : 1 как в комплексе, так и при предварительной обработке клеток олигохитозаном.

В результате проведенных экспериментов установлено, что присутствие в культуральной среде белков сыворотки сильно влияло на способность ЛПС взаимодействовать с клетками иммунной системы. Так, было показано, что в отсутствии сывороточных белков ЛПС в комплексе с ХН-110 более эффективно связывался с нейтрофилами, но при этом его поступление внутрь клетки уменьшалось (рис. 4а). Этот результат может быть связан с увеличением доступности эндотоксина для взаимодействия за счет изменения его надмолекулярной структуры в результате образования комплекса с ХН либо с присутствием на поверхности клетки сайтов связывания ХН. В пользу последнего предположения может свидетельствовать высокий заряд комплексов ЛПС : ХН-110 [11] и тот факт, что предварительная инкубация клеток с ХН-110 отменяла его стимулирующий эффект и даже ингибировала связывание ЛПС с нейтрофилами (рис. 4б), возможно, из-за существования общих для компонентов комплекса клеточных рецепторов (например, CD14) [26]. Олигохитозан менее эффективно стимулировал связывание ЛПС с клеткой. Вероятно, он имеет существенно более низкую по отношению к специфическим рецепторным молекулам, чем более высокомолекулярный ХН. В присутствии сыворотки резко увеличивалось поглощение ЛПС в комплексе с ХН-110. Этот эффект сохранялся, но в меньшей степени и при преинкубации клеток с хитозаном (рис. 4б). При этом количество ЛПС на поверхности клетки резко падало. Как результат, активация внеклеточным ЛПС сигнальных путей, обеспечивающих синтез провоспалительных цитокинов через внешние рецепторы (в частности TLR4), также должна была резко снижаться. Однако могла расти продукция цитокинов, опосредованная связыванием ЛПС с каспазой [10], что не всегда могло компенсировать это падение. В настоящей работе было зафиксировано уменьшение секреции клеткой ФНО-α при действии ХН (рис. 5). Это в свою очередь может быть связано с тем, что не весь поглощенный ЛПС может поступать в цитозоль и, скорее всего, это имеет место в настоящей работе. Кроме того, не исключается возможность ингибирования связывания ЛПС с каспазой в результате образования прочного комплекса с хитозаном.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института (Тихоокеанский Институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Meng Q., Sun Y., Cong H., Hu H., Xu F. J. A* // Drug Deliv. Translat. Res. 2021. V. 11. № 4. P. 1340–1351.
2. *Li J., Zhuang S.* // Eur. Polym. J. 2020. V. 138. P. 109984.
3. *Solov'eva T.F., Davydova V.N., Krasikova I.N., Yermak I.M.* // Mar. Drugs. 2013. V. 11. № 6. P. 2216–2229.
4. *Brandenburg K., Wiese A.* // Curr. Top. Med. Chem. 2005. V. 4. № 11. P. 1127–1146.
5. *Triantafilou M., Triantafilou K.* // J. Endotox. Res. 2005. V. 11. № 1. P. 5–11.
6. *Gioannini T. L., Weiss J. P.* // J. Immunol. Res. 2007. V. 39. № 1–3. P. 249–260.
7. *Ulevitch R.* // Annu. Rev. Immunol. 1995. V. 13. № 1. P. 437–457.
8. *Müller M., Scheel O., Lindner B., Gutsmann T., Seydel U.* // J. Endotox. Res. 2003. V. 9. № 3. P. 181–186.
9. *Rathinam V.A.K., Fitzgerald K.A.* // Nature. 2013. V. 501. № 7466. P. 173–175.
10. *Mazgaeen L., Gurung P.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 2. P. 379. https://doi.org/10.1111/1750-3841.1400210.3390/ijms21020379
11. *Davydova V.N., Volod'ko A.V., Sokolova E.V., Chusovitin E.A., Balagan S.A., Gorbach V.I. et al.* // Carbohydr. Polym. 2015. V. 123. P. 115–121.
12. *Yermak I.M., Davidova V.N., Gorbach V.I., Luk'yanov P.A., Solov'eva T.F., Ulmer A.J. et al.* // Biochimie. 2006. V. 88. № 1. P. 23–30.
13. *Быкова В.М., Немцев С.В.* Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана. М.: Наука, 2002. С. 16–19.
14. *Domszy J., Roberts G.* // Makromol. Chem. Phys. 1985. V. 186. № 8. P. 1671–1677.
15. *Давыдова В.Н., Набережных Г.А., Ермак И.М., Горбач В.И., Соловьева Т.Ф.* // Биохимия. 2006. Т. 71. № 3. С. 417–425.
16. *Triantafilou M., Triantafilou K., Fernandez N.* // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. № 8. P. 2218–2226.
17. *Harding S.E.* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1997. V. 67. № 2. P. 207–262.
18. *Park J.T., Johnson M.J.* // J. Biol. Chem. 1949. V. 181. № 1. P. 149–151.
19. *Henry D.C.* // Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. 1931. V. 387. № 1792. P. 133–146.
20. *Lehmann A.K., Sørnes S., Halstensen A.* // J. Immunol. Meth. 2000. V. 243. № 1–2. P. 229–242.
21. *Volod'ko A.V., Davydova V.N., Chusovitin E., Sorokina I.V., Dolgikh M.P., Tolstikova T.G. et al.* // Carbohydr. Polym. 2014. V. 101. № 1. P. 1087–1093.
22. *Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R. et al* // Nat. Nanotechnol. 2013. V. 8. № 10. P. 772–781.
23. *Wright S.D.* // Curr. Opin. Immunol. 1991. V. 3. № 1. P. 83–90.
24. *Зубарева А.А., Свирщевская Е.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 5. С. 448–454.
25. *Thornberry N.A.* // Cell Death and Differentiation. 1999. V. 6. № 11. P. 1023–1027.
26. *Otterlei M., Varum K.M., Ryan L., Espevik T.* // Vaccine. 1994. V. 12. № 9. P. 825–832.

Influence of Chitosanon on the Ability of LPS to Interact with Cells of the Immune System

V. N. Davydova[a], *, A. V. Volodko[a], V. I. Gorbach[a], S. V. Chusovitina[b], T. F. Solovyeva[a], and I. M. Ermak[a]

[a]*Pacific G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

[b]*Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*

**e-mail: vikdavidova@yandex.ru*

Complexes of lipopolysaccharide (**LPS**) from the bacterium Escherichia coli and chitosan (**CN**) with a molecular weight of 5 kDa were obtained and their supramolecular organization was studied. Using atomic force microscopy, it was shown that during the formation of complexes there is a transition from the micellar structure of the original LPS to linear network structures uniformly distributed over the surface of mica. The stability of LPS-CN complexes of various stoichiometries in biological media in the presence of serum proteins was investigated. It was shown that complexes with an LPS : CN ratio of 1 : 1 in the presence of serum proteins lost their surface charge and tended to aggregate; while complexes with maximum saturation of CN (1 : 5) did not aggregate under these conditions and maintained their surface charge. The effect of CNs of different molecular weights on the ability of LPS to interact with neutrophils in human whole blood was studied. It was observed that LPS-CN complexes were capable of binding to neutrophils and entering the cell, and this ability was enhanced in the presence of serum proteins. Chitosan exhibited the ability to suppress the synthesis of the proinflammatory cytokine TNF-α, induced by LPS, not only as part of the complex but also when cells were pretreated with a polycation.

Keywords: lipopolysaccharide, endotoxin, chitosan, supramolecular organization, cytokine-inducing activity

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 167–176

УДК 541.64:547.995

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАНА ИЗ ХИТИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ УЗБЕКИСТАНА И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ

© 2024 г. Р. Ю. Милушева[1], *, Г. Д. Ахымбетова[1], С. Ш. Рашидова[1]

[1]*Институт химии и физики полимеров АН Республики Узбекистан, Ташкент, 100128 Узбекистан*

** e-mail: rumilusheva@gmail.com*

Поступила в редакцию 19.09.2023 г.
После доработки 02.11.2023 г.
Принята к публикации 05.11.2023 г.

Из отходов производства шелка выделен хитозан *Bombyx mori*, охарактеризован его химический состав, определена молекулярная масса и степень деацетилирования хитозана, исследованы антибактериальные и иммунологические свойства. Выявлено, что хитин и хитозан обладали антибактериальной активностью по отношению к *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Bacillus subtilis*. Хитозан *B. mori* обладал также способностью увеличивать иммунный отклик живой системы: повышал число клеток как в центральных (тимус, костный мозг), так и в периферических (лимфатические узлы) органах иммунитета у мышей. Впервые получен хитозан из гидробионтов Аральского моря — цист *Artemia parthenogenetica*, исследован его состав и основные физико-химические характеристики. ИК-спектроскопические и рентгенологические исследования хитозана из цист *Artemia parthenogenetia* показали его чистоту. Определена молекулярная масса — 89 кДа и растворимость — 81.62%.

Ключевые слова: хитозан, *Bombyx mori*, отходы производства шелка, *Artemia parthenogenetica*, биологическая, иммунологическая активность

DOI: 10.31857/S0555109924020063 **EDN:** GAGJUR

В настоящее время вопросам рационального использования природных ресурсов и выделения из них природных полимеров, к которым относятся полисахариды и их производные, уделяется особое внимание. Хитин — один из наиболее распространенных в природе полисахаридов. Ежегодный биосинтез хитина превышает 100 млрд т. Синтез хитина происходит в особых клеточных органеллах (хитосомах) с участием фермента хитинсинтетазы путем последовательного переноса остатков N-ацетил-D-глюкозамина из уридиндифосфат-N-ацетил-D-глюкозамина на растущую полимерную цепь [1].

Получаемый из хитина хитозан и его производные обладают бактерицидными, антибактериальными, противораковыми и противовирусными эффектами, включая способность индуцировать агрегацию эритроцитов, способствовать активации тромбоцитов, активировать системы комплемента и др. [2–4]. Хитозан и его производные могут широко использоваться в качестве нетоксичных или малотоксичных антибактериальных материалов [5, 6]. Антибактериальные материалы можно отнести к новому классу функциональных материалов, способных подавлять микробный рост [7]. В качестве сырья для производства хитина (**ХТ**) и хитозана (**ХЗ**) используют отходы промысловых панцирных ракообразных, однако существуют ограниченные объемы их вылова.

В Узбекистане традиционно развито производство шелка, поэтому отходы его переработки — куколки тутового шелкопряда (**КТШ**) *Bombyx mori* — могут также быть источником для выделения природного полисахарида ХТ, модификацией которого можно синтезировать не менее востребованный ХЗ. Это тем более актуально, поскольку речь идет о таких отходах возобновляемого местного сырья, которые накапливаются в достаточных количествах (10000–15000 т в год) после переработки натурального шелка. В КТШ *Bombyx mori* содержится до 50–53% белков, 18–25% жировосковых веществ, помимо этого покров куколки состоит из ХТ, из которого в дальнейшем можно синтезировать ХЗ [8, 9]. Химический состав ХТ, выделяемого из КТШ *Bombyx mori*, в значительной степени зависит от зрелости личинок и полноценного формирования хитинового покрова, жесткости химической обработки при отделении шелкового волокна кокона от куколки, сорта грены и т.д.

Актуальность исследований по синтезу и модификации новых природных полимеров привела к поиску новых сырьевых источников, в частности в регионе Аральского моря. Однако Аральское море как среда обитания гидробионтов значительно изменилось в последние годы: изменился ионный состав воды, резко повысилась соленость, уменьшилось поступление биогенных элементов.

Начиная с 2000 г. на Аральском море проводились широкомасштабные акклиматизационные работы по направленному формированию фауны беспозвоночных, которые увенчались успехом. Акклиматизанты заняли ведущие места в зоопланктоне (*Artemia parthenogenetica, Calanipeda aquaedulcis*) и зообентосе (*Nereis diversicolor и Syndosmya segmentum*). Причем по мере осолонения моря их доля в общей биомассе зоопланктона и зообентоса постоянно увеличивается [10, 11]. Среди беспозвоночных, представленных в соленых водоемах Приаралья, вид *A. parthenogenetica* становится сейчас доминантным в зоопланктоне вследствие высокой минерализации водной среды. Рачки *A. parthenogenetica* стали практически единственным, успешно размножающимся видом в Аральском море, запасы которого в настоящее время достигают промысловых объемов.

Особую ценность представляют цисты, которые содержат высокий уровень полноценного белка, весь комплекс незаменимых аминокислот, водо- и жирорастворимых витаминов, легкоусвояемых липидов, полиненасыщенных жирных кислот, макро- и микроэлементов, стимуляторов роста, антиоксидантов [12], что позволит создать широкий ассортимент биопродуктов.

Благодаря высоким адаптационным свойствам *A. parthenogenetica* динамично меняет свой биохимический состав в зависимости от места обитания, качества пищи и времени сбора.

Цель исследования — подбор оптимальных условий выделения ХТ и синтеза ХЗ, сравнительное исследование химического состава выделяемого ХТ из двух различных источников (традиционного и вновь обнаруженного) и синтезированного ХЗ, а также исследование их биологической и иммунологической активности.

МЕТОДИКА

Хитинсодержащее сырье обрабатывалось по стандартным методикам [13, 14]. В качестве сырья для получения ХЗ использовали КТШ *Bombyx mori*, которые не содержали посторонних примесей, имели влажность 2–3%. Кондиционная масса КТШ, взятых для проведения работы, составляла 1.066 кг.

Выделение хитина и синтез хитозана *Bombyx mori*. КШТ (100 г) обрабатывали 1.0%-ным раствором NaOH (1000 мл) при постоянном перемешивании и температуре 60°С, выдерживали в течение 3–4 ч. ХТ отделяли фильтрованием через стеклянный фильтр (размер пор 125–130 мкм), промывали дистиллированной водой до pH 7.0 и высушивали на воздухе до постоянной массы.

Для получения ХЗ использовали гетерогенное деацетилирование концентрированной 30–50%-ной щелочью NaOH. Соотношение твердой фазы к раствору составляло 1 : 10, процесс осуществляли при температуре 120–130°С в течение 180 мин. Далее реакционную смесь промывали водой до нейтральной pH. Полученный продукт центрифугировали и высушивали при температуре 90–100°С. В зависимости от температуры и длительности процесса получали ХЗ различной молекулярной массы и СДА.

Выделение хитина и получение хитозана *A. parthenogenetica*. Для выделения ХТ использовались цисты *A. parthenogenetica*, измельченные до 40 мкм с влажностью 8–10%. Депротеинизацию сырья осуществляли путем обработки 3–4%-ным раствором NaOH при температуре 90–100°С и постоянном перемешивании в течение 3 ч. Деминерализацию осуществляли путем обработки 1.0 М раствором соляной кислоты при постоянном перемешивании в течение 2–4 ч при комнатной температуре.

Синтез ХЗ *A. parthenogenetica* осуществляли по той же методике, которую использовали для получения ХЗ *Bombyx mori*.

Очистка хитозана. Очистку ХЗ проводили по разработанной методике, которая заключалась в предварительном растворении ХЗ в 2%-ной уксусной кислоте, коагуляции и осаждении хитозана из раствора NaOH при pH 8–9, промывке водой и спиртом-ректификатом, центрифугировании и лиофильной сушке образца [15].

Для определения молекулярной массы готовили 0.5%-ный раствор ХЗ в 0.33 М ацетатном буферном растворе, pH 3.7. Молекулярную массу рассчитывали по формуле Марка–Куна–Хаувинка [16]:

$$M\eta = ([\eta] / K)1 / \alpha,$$

где $K = 1.4 \times 10^{-4}$ и $\alpha = 0.83$.

Степень деацетилирования (**СДА**) образцов определяли кондуктометрическим титрованием на приборе “Mettler-Toledo AG” (“Analytical CH-8603 Schwerzenbach”, Швейцария) с использованием в качестве титранта 0.1 М раствора NaOH для ХЗ, растворенного в 0.1 М растворе HCl, и рассчитывали по формуле [17]:

$$\text{СД} = \frac{203 \times N_{am}}{1400 + 42N_{am}} \times 100\%,$$

где N_{am} — содержание аминного азота.

Определение зольности проводили по следующей методике. Навеску образца (0.1–0.5 г) помещали в предварительно прокаленный и взвешенный фарфоровый тигель, который осторожно нагревали до 500°С. Сожжение образца проводили до постоянной массы. По окончании сжигания тигель охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Зольность образца (Z) вычисляли по формуле:

$$Z(\%) = m \times 100 / g,$$

где m — масса вещества после сожжения, г; g — навеска образца, г [18].

Для определения растворимости ХЗ в стеклянную колбу вносили навеску образца (0.1–0.5 г), добавляли 100 мл 2%-ной CH_3COOH и перемешивали до полного его растворения. Затем рабочий раствор отфильтровывали через фильтр Шотта и высушивали при 104°С в течение 2 ч [19].

Растворимость (P) определяли по формуле:

$$P\,(\%) = [(g - m)/g]\times 100,$$

где g — навеска вещества, г; m — количество вещества на фильтре, г.

ИК-спектроскопические исследования проводили на ИК-Фурье-спектрометре “Inventio-S” (“Bruker”, Германия) в диапазоне от 500 до 4000 $см^{-1}$ со спектральным разрешением 2 $см^{-1}$. Образцы готовили в виде таблеток с KBr под давлением 7×10^8 Па.

Рентгенографические исследования проводили на приборе “Miniflex 600” (“Rigaku”, Япония) с монохроматизированным Cu-Kα-излучением. Содержание общего азота в ХТ и ХЗ определяли методом Дюма [20] путем сжигания навески в кварцевой трубке в атмосфере двуокиси углерода.

Определение антимикробной активности. Чувствительность микроорганизмов к хитину и хитозану определяли диско-диффузионным методом. Для исследования готовили свежие 18-часовые культуры микроорганизмов, относящиеся к грамположительным коккам, грамотрицательным бактериям и грибам. На поверхность подсушенной питательной среды Мюллер–Хинтона в чашке Петри вносили 1–2 мл исследуемой культуры (по стандарту мутности 1.0×10^6 клеток), равномерно распределяли, избыток удаляли пипеткой. Параллельно с этим в отдельных пенициллиновых флаконах готовили исследуемые растворы ХТ (растворитель — диметилацетамид с добавлением 3% LiCl) и ХЗ (растворитель — уксусная кислота) в концентрации 1–5–10 мг/мл. В качестве контроля использовали 2%-ную уксусную кислоту. После посева чашки Петри подсушивали при комнатной температуре в течение 10–15 мин, затем стерильным пинцетом подготовленные бумажные диски, пропитанные растворами ХЗ, выкладывали на поверхность питательной среды, засеянной определенной культурой (на чашку не более 6 дисков). Чашки ставили в термостат при температуре 37°С, инкубировали в течение 18–24 ч. По истечении срока инкубации оценивали результат, помещая чашки на темную матовую поверхность. С помощью специальной линейки измеряли диаметр зоны задержки роста микробов вокруг дисков, включая диаметр самих дисков с точностью до 1 мм. Использовали штаммы микроорганизмов из Национальной коллекции НИИ микробиологии, эпидемиологии и инфекционных болезней Минздрава (Республики Узбекистан). Исследования проводили в Ташкентской медицинской академии.

Содержание лабораторных животных и обращение с ними осуществлялись в соответствии с требованиями положения “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей”.

Определение иммунологических и гематологических показателей в эксперименте. В качестве антигена использованы эритроциты барана (**ЭБ**), которые брали у животных из яремной вены в стерильные флаконы со стеклянными бусами. Перед иммунизацией их 2–3 раза центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об./мин и в дозе 2×10^7 вводили мышам однократно внутрибрюшинно.

В периферической крови иммунизированных мышей определяли титр антител к ЭБ, количество эритроцитов и лейкоцитов.

Статистическая обработка материала. Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием прикладных программ статистического анализа MS Excel с вычислением среднеарифметической ошибки (М), среднего квадратичного отклонения (σ), стандартной ошибки (m), относительных величин (%). Статистическая значимость полученных измерений при сравнении средних величин определялась по критерию (t) Стьюдента. За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности $p \pm 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение хитина и синтез хитозана из цист рачка *A. parthenogenetica* Аральского моря. В качестве сырья для получения ХЗ использовали цисты, для которых была использована модифицированная методика по выделению ХТ из КТШ *Bombyx mori*. Отличающим параметром для выделения ХТ из цист является стадия деминерализации сырья, так как, в отличие от КТШ, цисты довольно сильно минерализированы, поскольку это определялось соленостью водной среды Арала. Показано, что для получения однородных по свойствам ХТ и ХЗ требуются индивидуальные режимы обработки. Характеристики полученных образцов ХТ и ХЗ представлены в табл. 1.

Элементный анализ образцов выделенных ХТ показал, что содержание азота во всех образцах колебалось от 6.30 до 6.83%, что близко к теоретическим значениям и свидетельствовало о высокой степени чистоты полученных образцов. Содержание зольности в образцах ХТ и ХЗ, выделенных из цист *A. parthenogenetica*, незначительное, от 1.10 до 1.83% соответственно, что допустимо и соответствует данным, полученным при исследовании цист *Artemia sp.* [21], что также подтверждает факт получения достаточно чистых образцов ХТ и ХЗ.

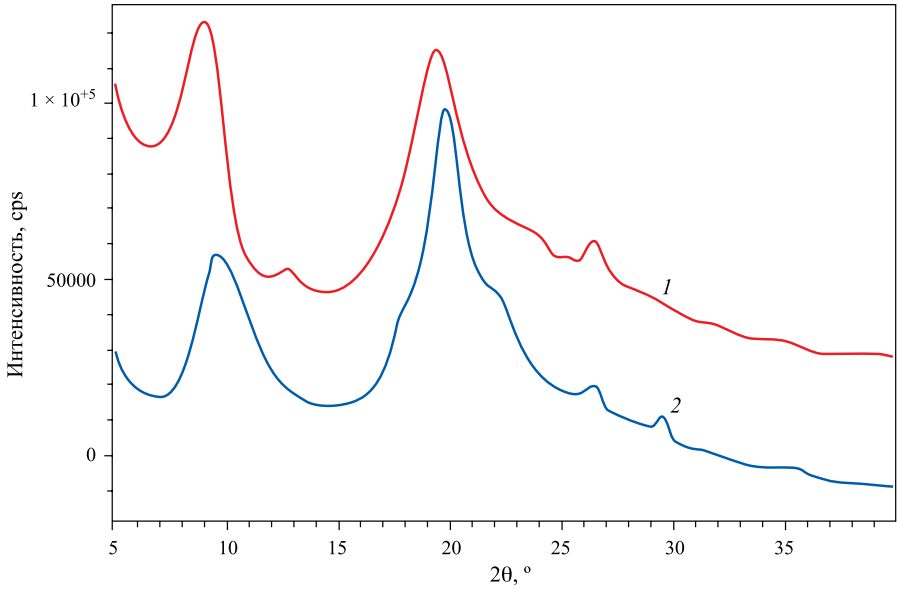

Рис. 1. Дифрактограммы хитина (*1*) и хитозана (*2*) из цист Аральского моря.

Как видно из табл. 1, по результатам элементного анализа полученные образцы ХЗ соответствуют показателям на ХЗ, отраженным в работе [14, 22]. Так, зольность в ХЗ из цист *A. parthenogenetia* Аральского моря составляет 1.83%, а содержание азота увеличивалось до 8.28%, что также близко к теоретическим значениям содержания азота в ХЗ, получаемым из различных источников [1, 14]. Эти показатели свидетельствовали о достаточной чистоте полученных образцов, что зависело от условий его синтеза.

ХЗ из цист *A. parthenogenetia* характеризовался невысокой молекулярной массой 89 кДа, которая свидетельствовала о незавершенном формировании ХТ цист, степенью деацетилирования 72% и хорошей растворимостью — 81.62%, то есть в данных условиях возможно получение ХЗ с определенными характеристиками.

Рентгенофазный анализ образцов показал, что на дифрактограммах ХТ из цист наблюдались кристаллические рефлексы с максимумами при 2θ = 9.5°, 19.5° в рассмотренном интервале углов рассеяния. Наиболее интенсивный максимум, наблюдаемый при 2θ = 19.5°, относился к кристаллографическому рефлексу (110). Рентгенофазный анализ показал, что ХТ, выделенный из цист *A. parthenogenetia* Аральского моря (рис. 1), существует в двух полиморфных модификациях, которые имеют различные кристаллические сингонии. Первая фаза — α-хитин с орторомбической сингонией — имеет параметры решетки: a = 4.85 Å, b = 19.05 Å, c = 9.31 Å, α = β = γ = 90.00°. Вторая фаза — β-хитин с параметрами решетки: a = 9.55 Å, b = 2.98 Å, c = 10.41 Å, α = γ = 90.00°, β = 97.43° обладает моноклинной сингонией. В образце ХТ, выделенного из цист, 65% кристаллической фазы имеет моноклинную сингонию, которая соответствует β-фазе, а 35% имеет орторомбическую сингонию, соответствующую α-фазе. Это подтверждает полиморфность образца хитина из цист.

Рентгенофазный анализ ХЗ из цист показал, что в образце существуют кристаллы с триклинной и моноклинной сингониями. ХЗ с триклинной сингонией имел параметры решетки: a = 2.63 Å, b = 9.01 Å, c = 16.19 Å, α = 75.80°, β = 105.00°, γ = 98.00°. Степень кристалличности при переходе ХТ в ХЗ уменьшалась, что хорошо согласовывалось с литературными данными [23, 24].

ИК-спектроскопические исследования ХТ, полученного из цист, выявили в спектре широкую полосу поглощения 3109–3600 см$^{-1}$ с максимумом в области 3444 см$^{-1}$ за счет валентных колебаний

Таблица 1. Качественные характеристики хитина и хитозана из цист *A. Parthenogenetia* и *Bombyx mori*

Образец хитина, цвет	Влажность, %	Зольность, %	Содержание азота, %	Выход, %
Хитин из цист (темно-зеленый порошок)	8–10	1.10	6.30–6.83	3–10.5
Хитозан из цист (желтый порошок)	6.0 ± 0.8	1.83 ± 0.4	8.28	3.0 ± 0.8
Хитозан *Bombyx mori* технический (коричневый порошок)	9.47	4.20	8.15	–
Хитозан *Bombyx* mori* очищенный (светло-бежевый порошок)	10.55	2.01	8.52	66.0

*Показатели для очищенного хитозана обр. № 5.

межмолекулярных и внутримолекулярных связанных ОН-групп и симметричных колебаний N–H аминогрупп (рис. 2). Наблюдалась полоса поглощения при 1653см$^{-1}$ — амид I (валентные колебания C=O групп). Полоса поглощения при 1561см$^{-1}$ вызвана угловой деформацией N–H аминогруппы. Полосы 1075 и 1029 см$^{-1}$ соответствуют валентным колебаниям групп C–O, то есть в ИК-спектре наблюдались все пики, характерные для ХТ, которые соответствуют литературным данным [25].

В ИК-спектре ХЗ выявлены валентные колебания CH–CH$_2$-групп в области 2925, 2923 и 2855 см$^{-1}$. Присутствовали также полоса поглощения в области 1658 см$^{-1}$, которую можно объяснить осевым растяжением связей C=O ацетамида (амид I), и полоса при 1596 см$^{-1}$ — угловая деформация N–H аминогруппы (амид II), а также интенсивные полосы поглощения различных деформационных колебаний в области 1382–1200 см$^{-1}$, то есть наблюдались все полосы поглощения, характерные для ХЗ.

При изучении качественного состава цист артемии Аральского моря было обнаружено, что в них содержались основные виды макро- и микронутриентов: белки — до 49%, липиды — до 16%, углеводы — до 30%, водорастворимые витамины — B$_1$, B$_2$, PP, B$_6$, C, микроэлементы в достаточно большом количестве, а также эссенциальные макроэлементы — K, Ca, Mg, Na, P [26]. Такой исходный состав источника сырья может служить предпосылкой для создания в дальнейшем производства нутрицевтиков и БАДов в экологически кризисных зонах Приаралья.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что получены ХТ и ХЗ достаточной степени чистоты из нового источника — цист *A. parthenogenetia* Аральского моря, исследованы физико-химические свойства образцов. Использование нового сырья в качестве источника ХТ позволит увеличить производство этого природного биополимера и его производных и расширить ассортимент используемого сырья. Получение биологически активных природных полимеров из отходов переработки шелка, обладающих ценными функциональными свойствами, является востребованным для Узбекистана. Отходы — куколки тутового шелкопряда (**КТШ**) — представляют природный композит из хитина, липидов и белка и составляют около 50% от массы коконной оболочки. При производстве шелка волокнистые отходы используют на 30%, а куколки практически не используют. Поэтому в данной работе приводятся исследования по получению ХЗ из КТШ и исследование его физико-химических и биологических свойств.

Выделение хитина и синтез хитозана из КТШ *Bombyx mori*. Для получения ХЗ из КТШ необходимо было последовательно отделить белковую и минеральную составляющие сырья, перевести их в растворимое состояние и удалить [8]. ХТ и ХЗ выделяли из КТШ путем очистки и переработки исходного сырья, что позволило выявить наиболее общие и важные параметры при получении ХТ и ХЗ.

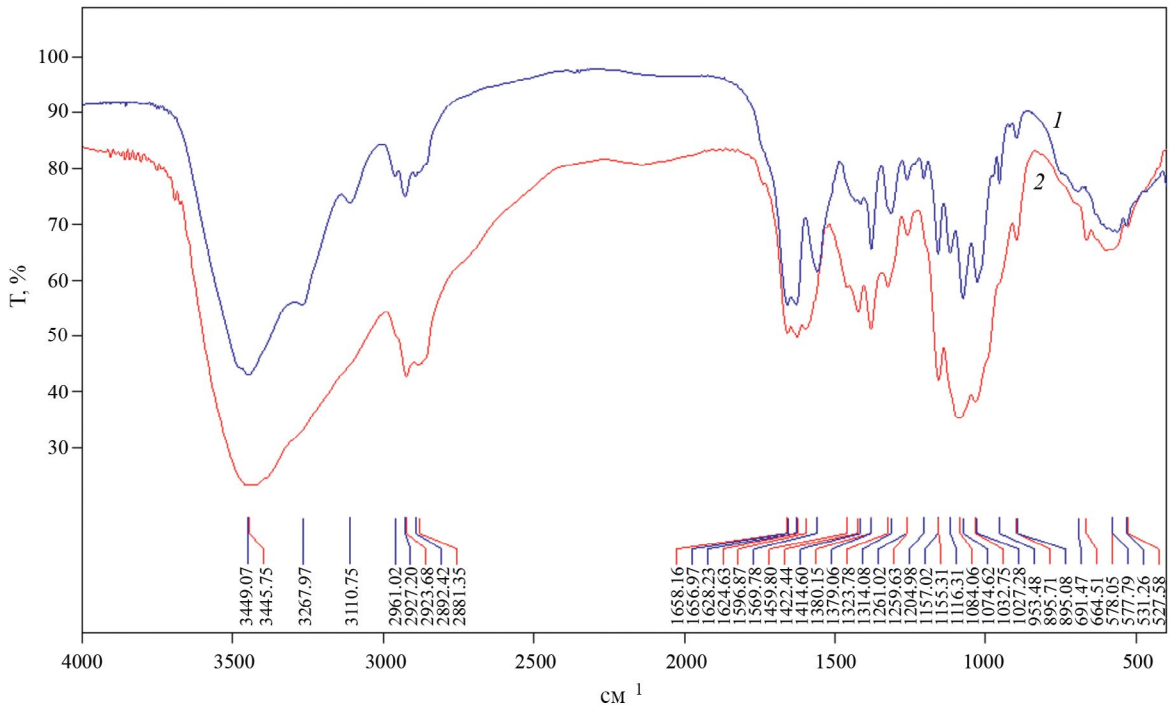

Рис. 2. ИК-спектры: ХТ (*1*) и ХЗ (*2*) из цист Аральского моря.

Процесс щелочного деацетилирования имел ряд особенностей. Высокая устойчивость ХТ к деацетилированию объясняется наличием водородной связи между карбонильной группой и азотом амидной группы [27]. Для разрушения этой прочной связи процесс вели при повышенной температуре. С увеличением температуры степень деацетилирования достигала предельного значения, но при этом снижалась молекулярная масса, поэтому для каждого вида сырья подбирались индивидуальные режимы при сохранении общепринятых принципов. При проведении синтеза при 120° С СДА и ММ полученных образцов ХЗ составляли 95% и 100 кДа соответственно (табл. 2).

Изучено влияние температуры и времени реакции, а также концентрации щелочи на молекулярные характеристики ХЗ. Показано, что увеличение концентрации щелочи в диапазоне 35–50% обусловливало увеличение степени деацетилирования ХЗ от 60 до 95%, увеличение времени реакции с 90 до 180 мин приводило к снижению молекулярной массы от 115 до 100 кДа.

Было изучено влияние температуры реакции на молекулярную массу и скорость деацетилирования полученного ХЗ. Обнаружено, что значительное уменьшение молекулярной массы и приведенной вязкости ХЗ происходит с повышением температуры реакции, что свидетельствовало о частичной деструкции ХЗ. Однако при высокой температуре происходило ускорение реакции деацетилирования, при этом содержание общего азота и свободных аминогрупп увеличивалось (табл. 3).

Результаты показали, что присутствие 50%-ного NaOH, продолжительность реакции 3 ч и температура 120°С являются оптимальными параметрами для проведения реакции деацетилирования ХТ и получения ХЗ из КТШ с высокой степенью деацетилирования. Полисахарид ХЗ характеризовался химической неоднородностью, широким молекулярно-массовым распределением и содержал небольшое количество минеральных примесей. Для дальнейшего использования необходимо было провести очистку ХЗ от примесей последовательным растворением технического хитозана

Таблица 2. Влияние условий реакции на свойства хитозана *B. mori* (соотношение ХТ : NaOH = 1 : 10, температура 120°С)

Условия деацетилирования хитина		Физико-химические свойства хитозана			
NaOH, %	Время, мин	N,%	СДА, %	NH_2, %	Молекулярная масса, кДА
50	180	8.5	95	7.4	100
50	120	8.2	87	7.10	110
50	90	7.4	66	4.2	115
40	180	8.0	70	5.6	130
40	120	7.2	67	4.8	140
30	180	6.8	60	4.1	125

Таблица 3. Характеристики хитозана, полученного при различных температурах проведения реакции деацетилирования хитина (соотношение ХТ : NaOH = 1 : 10, продолжительность реакции 180 мин)

Температура, °С	NH_2, %	Общий азот, %	СДА, %	[ή], г/дл	ММ, кДа
120	7.10	8.20	87	2.20	110
100	6.60	7.95	83	2.24	116
85	4.96	6.52	76	2.80	151
60	4.20	6.50	66	2.90	160

Таблица 4. Физико-химические характеристики очищенного ХЗ из отходов производства шелка

Показатель	Технический хитозан	Очищенный хитозан, №				
		1	2	3	4	5
Содержание азота, %	8.15	8.28	8.48	8.35	8.49	8.52
Растворимость в 2%-ной CH_3COOH, %	78.50	96.70	98.37	98.22	98.83	98.85
Зольность, %	4.20	2.13	1.79	1.43	1,61	2.01
Влажность, %	9.47	11.85	11.17	10.78	10.34	10.55
СДА, %	70.50	77.20	88.30	81.10	88.80	90.50
ММ, кДа	140	135	127	120	125	109
Выход, %	–	62.5	65.8	63.7	67.2	66.0

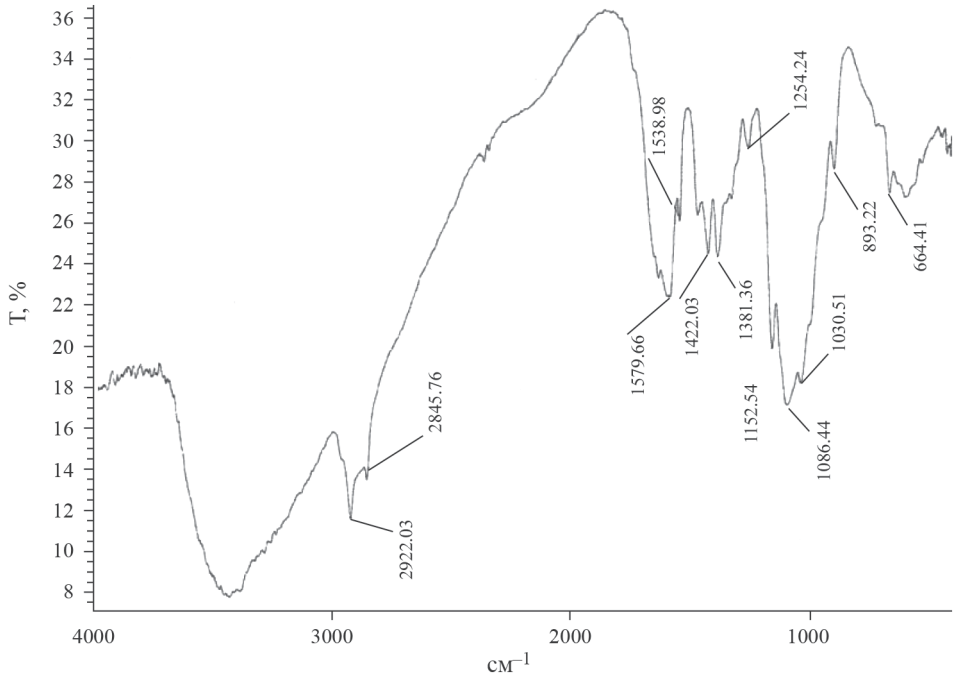

Рис. 3. ИК-спектр хитозана *B. mori.*

в 2%-ной уксусной кислоте и осаждением 0.5 N NaOH при pH 8–9, промывкой до pH 7 и лиофильной сушкой. При проведении очистки было получено пять образцов ХЗ (табл. 4). Очищенный ХЗ имел размер частиц 0.2–0.6 мм и выход 62–67%, pH 1%-ной водной суспензии полученных образцов хитозана не более 7.5. Содержание азота и растворимость полученных образцов достигало 8.28–8.52 и 96.7–98.85% соответственно. Уменьшение зольности образцов с 4.2 до 1.43–2.13% также свидетельствовало об увеличении чистоты образца. Степень деацетилирования очищенных образцов ХЗ всех партий составляла 77–90%, молекулярная масса колебалась в пределах 109–135 кДа. Условия проведения очистки хитозана принципиально не различались, поэтому все партии полученного ХЗ имели близкие показатели. Однако, в зависимости от СДА, наблюдались небольшие различия по растворимости и молекулярной массе образцов. Очевидно, на эти параметры повлияло время,

Таблица 5. Антимикробная активность хитина *B.mori*

Вид	Контроль – ДМАА	Хитин		
		0.5%	1.0%	2.0%
S. aureus, № 2000, рег.004870	8.0 ± 0.3	8.0 ± 0.2	10.0 ± 0.1	13.0 ± 0.1
S. epidermidis, № 12, рег.004705	8.0 ± 0.1	15.0 ± 0.3	18.0 ± 0.2	24.0 ± 0.5
S. saprofiticus, № 121, рег.002771	0	13.0 ± 0.1	14.0 ± 0.2	18.0 ± 0.2
E. coli ЛП, № 051, рег.002839	10.0 ± 0.2	10.0 ± 0.1	20.0 ± 0.4	25.0 ± 0.5
P. vulgaris, № 49, рег.005047	0	10.0 ± 0.2	16.0 ± 0.2	18.0 ± 0.2
P. aerogenosa, № 237, рег.003480	0	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
C. albicans, № 10, рег.003848	0	0	0	5.0 ± 0.1
B.subtilis, № B-1, рег.003591	0	10.0 ± 0.2	7.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1

Примечание: зоны задержки роста представлены в мм.

необходимое для коагуляции очищенного ХЗ. Для дальнейших исследований использовали образец очищенного хитозана № 5 с ММ 109 кДА, СДА 90.5% и растворимостью 98.85%.

Получение ХЗ из ХТ было доказано данными ИК-спектроскопии и элементного анализа. В ИК-спектре ХЗ присутствуют характерные полосы поглощения при волновых числах 3450, 2923 и 2845 $см^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям OH-, NH- и CH-, CH_2-групп (рис. 3).

Выраженные полосы поглощения при 1579 и 1422 $см^{-1}$ соответствуют деформационным колебаниям NH-, CN-, CO- и CH-, CH_2-групп. Полосы поглощения, характеризующие CO-, COC-эфирные связи, наблюдаются при 1152 и 1086 $см^{-1}$, также имеются полосы поглощения маятникового колебания CH_2-групп при 664 $см^{-1}$.

Выделенная масса ХТ с минеральными примесями составляла около 20% от общей массы отходов.

Антибактериальная активность — это одно из первых биологических свойств, которые были обнаружены у ХЗ. Исследованиями последних лет было установлено, что природные биополимеры, такие как ХЗ, стимулируют клеточный метаболизм и в первую очередь активируют функции клеток иммунной системы [28]. Широкий спектр действия препаратов объясняется тем, что роль полисахаридов заключается не столько в прямом воздействии на пораженный участок, сколько в локальной активации защитных ресурсов организма.

Полученный хитозан с молекулярной массой (**ММ**) 109 × 10^3 Да и степенью деацетилирования (**СДА**) 90.5% испытывали на способность подавлять различные штаммы микроорганизмов, относящиеся к грамположительным коккам *Staphylococcus aureus, Staphyloccocus epidermidis, Staphyloccocus saprophyticus, Bacillus subtilis,* к грамотрицательным бактериям: *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa*, грибам *Candida albicans.* Результаты изучения антибактериальной активности ХТ и ХЗ *Bombyx morino* по отношению к различным штаммам микроорганизмов приведены в табл. 6 и 7.

Показано, что ХТ оказал довольно выраженное действие в концентрации 0.5% на микробные культуры, такие как *S. epidermidis, S. saprophyticus*, *S. pyogenes*, *E. coli* и *P. vulgaris*. Интересно отметить, что с увеличением концентрации этого полимерного препарата от 1 до 2% антибактериальное действие его достоверно возрастало (табл. 5).

Испытание ХЗ в концентрациях 1.0 и 0.5% показало, что этот препарат в повышенной концентрации оказывался еще более эффективным, чем ХТ, так как к нему оказались чувствительными почти все группы микроорганизмов (табл. 6).

Из табл. 6 видно, что антибактериальная активность ХЗ имела тенденцию с повышением концентрации усиливать степень их воздействия и расширять спектр подавляемых микробов. Так, если в концентрации 0.5% ХЗ был активен по отношению к *S. saprofiticus, S. epidermidis* и *S. pyogenes*, то при повышении концентрации до 1.0% он стал активным ко всей группе стафиллококов, грамотрицательным микроорганизмам *E. coli, P. aeruginosa* и к грибам *C. albicans*. ХЗ *Bombyx mori* проявлял антимикробную активность и оказывал бактерицидное действие как на грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. Одним из положительных действий ХЗ является его антистафилококковое воздействие, что, безусловно, важно при лечении гнойно-воспалительных заболеваний, так как стафилококк занимает ведущее место в этиологии гнойных заболеваний.

Механизм действия природных полисахаридов на центральные и периферические органы иммунитета, кроветворные стволовые клетки, иммунную систему в целом еще недостаточно изучен. Решение этих вопросов позволит разработать новые высокоэффективные лекарственные препараты как для лечения, так и для профилактики различных состояний.

Было изучено влияние ХЗ на иммунологические показатели: количество клеток в центральных

Таблица 6. Антимикробное действие ХЗ *B.mori* по отношению к различным культурам

Вид	Контроль — CH_3COOH	Хитозан	
		1.0%-ный раствор	0.5%-ный раствор
S. aureus, № 2000, рег.004870	8.0 ± 0.3	20.0 ± 0.3	10.0 ± 0.1
S. epidermidis, № 12, рег.004705	8.0 ± 0.1	25.0 ± 0.5	18.0 ± 0.2
S. saprofiticus, № 121, рег.002771	0	20.0 ± 0.4	15.0 ± 0.2
E. coli ЛП, № 051, рег.002839	10.0 ± 0.1	12.0 ± 0.2	8.0 ± 0.1
P. vulgaris, № 49, рег.005047	0	15.0 ± 0.2	8.0 ± 0.1
P. aerogenosa, № 237, рег.003480	0	10.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
C. albicans, № 10, рег.003848	0	15.0 ± 0.2	7.0 ± 0.1
B. subtilis, № B-1, рег.003591	0	10.0 ± 0.2	7.0 ± 0.1

Примечание: зоны задержки роста представлены в мм.

Таблица 7. Влияние ХЗ *B. mori* на количество клеток в центральных и периферических органах иммунитета у мышей ($M \pm m$, $n = 6$)

Группа	Доза, мг/кг	Клетки Тимуса, $\times 10^6$	ИС*	Клетки костного мозга, $\times 10^6$	ИС*	Клетки лимф. узлов, $\times 10^6$	ИС*
Контроль	–	42.2 ± 2.1	–	9.7 ± 0.4	–	26.7 ± 1.5	–
Хитозан	100.0	39.3 ± 2.1	–1.07	18.8 ± 0.5	+1.94	26.3 ± 1.4	–1.02

*ИС — отношение экспериментальных данных к контролю.

Таблица 8. Влияние ХЗ *B. mori* на количество эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови у мышей

Группа	Доза, мг/кг	Эритроциты, $\times 10^9$/мл	ИС	Лейкоциты, $\times 10^6$/мл	ИС
Контроль	–	4.9 ± 0.1	–	6.8 ± 0.2	–
Хитозан	100.0	7.1 ± 0.2*	+1.45	9.4 ± 0.3*	+1.38

Примечание: ИС — отношение экспериментальных данных к контролю.

и периферических органах иммунитета, количество эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови у мышей (табл. 7).

Под воздействием ХЗ число костномозговых клеток достоверно повышается в 1.94 раза ($18.8 \pm 0.5 \times 10^6$). ХЗ, не влияя на число клеток в тимусе, почти в 2 раза повышает число клеток в костном мозге (табл. 7). Определено также влияние ХЗ на количество эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови у мышей (табл. 8). При использовании препарата уровень эритроцитов и лейкоцитов в крови мышей значительно повысился: ХЗ в 1.45 раза повышает число эритроцитов и в 1.38 раза — число лейкоцитов.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что ХЗ обладал иммуностимулирующими свойствами, поскольку при его использовании происходило повышение числа клеток как в костном мозге, так и увеличение количества лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови.

Изучены оптимальные условия выделения ценных природных биополимеров: ХЗ из цист *A. parthenogenetia* Аральского моря и из КТШ *Bombyx mori*. Получен ХЗ из цист *A. parthenogenetia* с молекулярной массой 89 кДа, степенью деацетилирования 72% и растворимостью 81.62%. Показано, что возможно выделение ХЗ из КТШ достаточной степени чистоты с различной молекулярной массой и СДА в зависимости от условий синтеза и степени очистки. ХЗ из КТШ имеет более высокую молекулярную массу 100–160 кДа, высокую СДА — до 90% и растворимость 88%. Методами ИК-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа показана чистота выделяемого ХЗ из различных источников. У ХТ из цист *A. parthenogenetia* Аральского моря наблюдается два типа модификации α и β с соответствующими сингониями, что подтверждает его полиморфную структуру.

Показана антибактериальная активность ХЗ *B. mori*, которая имеет тенденцию с повышением концентрации расширять спектр подавляемых бактерий и оказывать бактерицидное действие как на грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. ХЗ *B. mori* оказывал иммуностимулирующее воздействие на живые организмы, что позволяет рекомендовать препараты на основе ХЗ для укрепления иммунитета.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена за счет средств бюджета института (Институт химии и физики полимеров АН РУз, Узбекистан). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Содержание лабораторных животных и обращение с ними осуществлялись в соответствии с требованиями положения “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” и законодательством и принятыми нормативами АН РУз, Узбекистан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хитозан / Под ред. К. Г. Скрябин, С. Н. Михайлов, В. П. Варламов. М.: Центр Биоинженерия РАН, 2013. 593 с.
2. *Caracciolo G., Vali H., Moore A., Mahmoudi M.* // Nano Today. 2019. V. 27. № 6. P. 10. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.06.001
3. *Sheik S., Nagaraja G. K.; Chandrashekar K. R.* // Mater. Today Proc. 2018. V. 5. № 10. P. 21011–21017.
4. *Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 2. P. 487. https://doi.org/10.3390/ijms21020487

5. *Belbekhouche S., Bousserrhine N., Alphonse V., Le Floch F., Charif Mechiche Y., Menidjel I., Carbonnier B.* // Colloids Surf. B. 2019. V. 181. P. 158–165.
6. *Le-Vinh B., Minh N., Le N., Nazir I., Matuszczak B., Bernkop-Schnürch* A. // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 133. P. 647–655. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.081
7. *Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 487. https://doi.org/10.3390/ijms21020487
8. *Рашидова С. Ш., Милушева Р. Ю.* Хитин и хитозан *Bombyx mori*. Синтез, свойства и применение. Ташкент: ФАН, 2009. 246 с.
9. *Милушева Р. Ю., Авазова О. Б., Рашидова С. Ш.* Белок из куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. Выделение, свойства, применение. Ташкент: ФАН, 2020. 216 с.
10. *Mirabdullayev I., Abdullaeva L., Musaev A., Zholdasova I., Mustafaeva Z., Jumaniezova N.* // Geophysical Research Abstracts. 2007. V. 9. P. 772.
11. *Aladin N. V., Plotnikov I. S.* // Proceedings of the Zoological Institute RAS. 2008. V. 312 № 1–2. P. 145–154.
12. *Rudneva I. I.* Artemia/Prospects for Use in the National Economy. Kiev: Naukova Dumka, 1991. C. 6–23.
13. *Ravikumar N. V.* // Reactive and Functional Polymers. 2000. V. 46. P. 1–27.
14. *Muzzarelli R. A.A.* The Discovery of Chitin. In: Chitosan in Pharmacy and Chemistry / Ed. R.A.A Muzzarelli, C. Muzzarelli. Italy: Atec., 2002. P. 1–8.
15. *Милушева Р. Ю., Пирниязов К. К., Рашидова С. Ш.* // Вестник Тверского гос. ун-та. Серия: Химия. 2016. № 2. С.119–124.
16. *Gamzazade A. I., Shlimak B. M., Sklyar A. M., Stykova E. V., Pavlova S. A., Rogozin S. V.* // Acta. Polym. 1985. V. 36. № 8. P. 421–424.
17. *Погодина Н. В., Павлов Г. М., Бунин С. В., Меньшиков А. В.* // Высокомолек. соединения. 1986. № 28. С. 232–239.
18. Государственная фармакопея СССР. 2012. XI. М: Медицина, Т. 2. С. 24.
19. Государственная фармакопея СССР. 1987. XI. М: Медицина, Т. 1. С. 175.
20. *Климова В. А.* Основные микрометоды анализа органических соединений. Москва: Химия, 2001. 75 с.
21. *Литвиненко Л. И., Бойко Е. Г.* // Биология внутренних вод. 2008. № 1. С. 40–48.
22. *Bansal V., Sharma P. K., Sharma N.* // Adv. Biol. Res. 2011. V. 5. № 1. P. 28–37.
23. *Rinaudo M.* // Progress in Polymer Science. 2006. V. 31. P. 603–632.
24. *Kumar M. R., Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C., Sashiva H., Domb A. J.* // Chemical Reviews. 2004. V. 104. P. 6017–6084.
25. *Югай С. М., Шахобутдинов С. Ш., Атаханов А. А., Рашидова С. Ш.* // Химический журнал Казахстана. 2019. Т. 67. № 3. С. 254–265.
26. *Хажибаев К. Г. Бердимбетова Г. Е., Карлыбаева Б. П., Ощепкова Ю. И.* // Universum: химия и биология: электрон. научн. журн. 2019. № 9. С. 63. http://7universum.com/ru/nature/archive/item/7769
27. *Ильина А. В., Варламов В. П.,* Ермаков Ю. А. // Докл. Академии наук. 2008. Т. 421. № 2. С. 199–201.
28. *Chen Y. M., Chung Y. C., Wang L. W., Chen K. T., Li S. Y.* // J. Environ. Sci. Health A. 2002. V. 37. P. 1379.

Obtaining Chitosan from Chitine-Containing Uzbekistan Raw Materials and Research of Antimicrobial Properties

R. Yu. Milusheva[a], *, G. D. Akhymbetova[a], and S. Sh. Rashidova[a]

[a] *Institute of Polymer Chemistry and Physics of Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, 100128 Uzbekistan,*

** e-mail: rumilusheva@gmail.com*

The optimal conditions for the isolation of valuable natural biopolymers were revealed. chitosan from cysts of *Artemia parthenogenetia* in the Aral Sea and from pupae of the silkworm *Bombyx mori*. Chitosan (**Chs**) was obtained from cysts of *A. parthenogenetia* with a molecular weight of 89 kDa, degree of deacetylation (**DDA**) — 72% and solubility — 81.62%. It has been shown that it is possible to isolate Chs from silkworm pupae of sufficient purity with different molecular weights and DDA depending on the synthesis conditions and the degree of purification. *Bombyx mori* Chs has a higher molecular weight of 100–160 kDa, a high DDA — up to 90% and a solubility of 88%. IR spectroscopy, X-ray diffraction and elemental analysis have shown the purity of the isolated Chs from various sources. In chitin from *A. parthenogenetia* cysts of the Aral Sea, two types of modifications α and β with corresponding syngonies are observed, which confirms its polymorphic structure. The antibacterial activity of *B. mori* Chs has been shown, which tends to expand the spectrum of suppressed bacteria with increasing concentration and have a bactericidal effect on both gram-negative and gram-positive bacteria. Chs *B. mori* had an immunostimulating effect on living organisms, which allows us to recommend drugs based on Chs to strengthen the immune system.

Keywords: chitosan, *Bombyx mori*, silk production waste, *Artemia parthenogenetica*, biological, immunological activity

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 177–182

УДК 632.9: 577.1:544.77

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДИСПЕРСИЙ НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ДРОБНОГО ОСАЖДЕНИЯ

© 2024 г. Э. В. Попова[1, *], Н. С. Домнина[2], И. И. Новикова[1], Н. М. Коваленко[1], И. Л. Краснобаева[1, **], И. М. Зорин[2]

[1]*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, 196608 Россия*

[2]*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Петергоф, 199034, Россия*

**e-mail: elzavpopova@mail.ru,*

***e-mail: krasnobaeva08@mail.ru*

Поступила в редакцию 12.08.2023 г.
После доработки 31.10.2023 г.
Принята к публикации 05.11.2023 г.

Проведена оценка антигрибной и иммуномодулирующей активности дисперсий наночастиц хитозана, полученных методом дробного осаждения при pH 5.0 и pH 7.5 с использованием хитозана разной молекулярной массы. Дисперсия наночастиц, полученная при pH 5.0, обладала повышенной фунгистатической активностью в отношении *Cohliobolus sativus* и *Alternaria solani* за счет высокой доступности аминогрупп в рыхлых наночастицах. Такая дисперсия показала иммуностимулирующую активность, обеспечивающую повышение устойчивости пшеницы к темно-бурой пятнистости. Установлено также, что элиситорная активность дисперсий нанохитозана значительно выше активности растворов исходного полимера.

Ключевые слова: хитозан, нанохитозан, антигрибная, элиситорная активности, *Alternaria solani*, *Cohliobolus sativus*, пшеница

DOI: 10.31857/S0555109924020073 **EDN:** GAAFKU

В настоящее время природный полимер хитозан стал наиболее востребованным биоматериалом в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве [1–3]. Хитозан привлекает внимание ученых своим спектром биологической активности (антигрибная, антибактериальная, антивирусная, элиситорная и др.), что обусловливает широкое его применение в растениеводстве в качестве средств, стимулирующих рост и развитие растений, а также в препаратах, защищающих многие сельскохозяйственные культуры от грибных, вирусных и бактериальных заболеваний [4, 5].

При создании новых препаратов на основе хитозана используют методические подходы, связанные с различными видами химической и структурной модификации полимера, что, как правило, приводит к усилению биологической активности. Так, например, в структуру полимерной цепи вводят различные функциональные фрагменты биологически активных соединений (сигнальные молекулы, антиоксиданты и др.), что придает хитозану совершенно новые свойства [6, 7].

Известно, что ограниченная растворимость хитозана в водных средах (pH $\geqslant$ 6) вносит существенные ограничения для его использования в растениеводстве. Проведение химической модификации хитозана помогает решить эту проблему. Так, карбоксиметилирование, сукцинилирование хитозана, получение его четвертичных солей обеспечивает растворимость полимера в более широкой области значений pH. Еще одним приемом повышения растворимости хитозана является его деструкция вплоть до молекулярных масс порядка 5–10 кДа [4, 6, 8, 9].

Современным и перспективным подходом к созданию препаратов для агрохимии является модификация хитозана путем формирования из него при нейтральных значениях pH нано- или микрочастиц в виде стабильной дисперсии [10]. Установлено, что физические, химические и, главное, биологические свойства наночастиц существенно отличаются от свойств полимеров, из которых они получаются. Объяснением особых свойств наночастиц служит сочетание их маленького размера и большой удельной поверхности. Причем, чем меньше размер частиц, тем выше их способность проникать через биомембраны клетки, возможность доставлять биологически активные вещества в клетки и др. [11].

К настоящему времени использование наночастиц хитозана для создания различных препаратов, повышающих устойчивость растений

к биотическим и абиотическим стрессам, описано в многочисленных обзорных статьях [12–15].

Так, например, наночастицы хитозана были использованы в качестве носителей для доставки в клетки растений микроэлементов, питательных веществ, пестицидов и др. [16, 17]. В ряде работ продемонстрирована более высокая антибактериальная и фунгистатическая активность дисперсий наночастиц по сравнению с раствором хитозана [18–20]. *Появились сообщения о том*, что наночастицы хитозана могут действовать как иммунологический модулятор в растениях чая и пальчатого проса, индуцируя активность защитных ферментов [21, 22]. На примере *Camellia sinensis* впервые была доказана способность наночастиц хитозана усиливать врожденный иммунитет. Было установлено, что обработка листьев *C. sinensis* дисперсией наночастиц вызывает увеличение активности антиоксидантных ферментов, уровней фенолов и флавоноидов по сравнению с контрольным опытом, где обработка проводилась раствором хитозана [21]. Кроме того, было замечено, что несмотря на то что и хитозан, и наночастицы связываются с поверхностью листа, наночастицы имеют повышенный уровень внеклеточной локализации и биодоступности. Этим объясняется десятикратное снижение действующей концентрации и существенное повышение эффективности дисперсий наночастиц.

Подтверждением эффективности использования наночастиц для повышения болезнеустойчивости растений являются результаты работы, в которой показано, что обработка семян проса дисперсией наночастиц индуцировала системную устойчивость к ложной мучнистой росе и приводила к снижению пораженности растений в 5 раз [23]. Об элиситорной активности наночастиц хитозана сообщается в работе [22], в которой авторы связывают снижение проявления симптомов пирикуляриоза на листьях проса с применением наночастиц хитозана.

Из представленного небольшого обзора литературы видно, что изучение и применение в растениеводстве наночастиц хитозана в виде дисперсий, обладающих разнообразной биологической активностью, является актуальной задачей.

Цель работы — оценка антимикробной и иммуномодулирующей активности дисперсий наночастиц хитозана, полученных методом дробного осаждения с использованием хитозана разной молекулярной массы.

МЕТОДИКА

Для получения наночастиц методом дробного осаждения были использованы образцы хитозана с молекулярной массой 6.5, 14 и 60 кДа, ранее полученные по известной методике [24] из хитозана с молекулярной массой 150 кДа и степенью деацетилирования 85% (ООО “Биопрогресс”, Россия). Получения наноструктурированной формы хитозана и соответствующих дисперсий, а также их характеристика проводили в соответствии с методикой, описанной в работе [25]. С этой целью к 0.1%-ному раствору хитозана в уксусной кислоте при постоянном перемешивании и температуре 20°C приливали 0.1 н. раствор гидроксида калия со скоростью 0.2 мл/мин с использованием шприцевого насоса “Bestran” до достижения необходимого значения pH. Далее посредством специальной обработки (фильтрования, действия ультразвука, ресуспендирования и др.) были получены образцы наночастиц хитозана в виде дисперсий.

Для проведения биологических испытаний использованы два типа дисперсий наночастиц хитозана (НХ): дисперсии НХ и дисперсии НХ-5. Дисперсии НХ содержали наночастицы, выделенные из реакционной смеси при pH 8 и промытые до нейтральных значений pH. Частицы в дальнейшем ресуспендировали в деионизированной воде (pH 6.5). Размер НХ в этих дисперсиях находится в диапазоне 5–25 нм. Дисперсии НХ-5 имели в своем составе гелеобразные мягкие частицы диаметром около 100 нм, представляющие собой агрегаты макромолекул хитозана, а также наночастицы хитозана, образовавшиеся при дробном осаждении при pH 5. Для проведения экспериментов из “Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей” Центра коллективного пользования научным оборудованием “Инновационные технологии защиты растений” ВИЗР были предоставлены следующие штаммы фитопатогенных грибов: *Alternaria solani* Sorauer, *Cohliobolus sativus* (S. Itod Kurib).

Оценку антигрибной активности по отношению к *A. solani и C. sativus* (возбудители листовых пятнистостей широкого спектра сельскохозяйственных культур) проводили методом агаровых блоков [26].

При изучении прямого фунгистатического действия исследуемых образцов методом агаровых блоков в теплую агаризованную среду Чапека вносили дисперсию наночастиц определенного объема, рассчитывая конечную концентрацию в среде в зависимости от исходной концентрации наночастиц. После застывания среды на поверхности среды помещали блоки 10-суточных микромицетов *C. sativus* и *A. solani* диаметром 6 мм. В качестве контроля служили чашки с агаризованной средой Чапека с блоками тест-культуры без испытуемых образцов. Чашки инкубировали в темноте при 25°C. Фунгистатическую активность оценивали по диаметру подавления роста тест-культуры через 3 и 5 сут выращивания. Для этого диаметр колонии гриба в опытных чашках, содержащих НХ, сравнивали с контролем (чашки без НХ). Процент ингибирования роста мицелия гриба (П) рассчитывали относительно контроля по следующей формуле:

$П = (Д_к – Д_{оп} / Д_к) \times 100$, где П — подавление роста гриба по сравнению с контролем,%; $Д_к$ — диаметр колонии гриба в контроле, мм; $Д_{оп}$ — диаметр колонии гриба в опыте, мм [26].

Элиситорную активность исследуемых дисперсий НХ оценивали методом отделенных листьев [21] в нашей модификации. Семисуточные проростки пшеницы восприимчивого сорта Саратовская 29 опрыскивали дисперсией НХ, дисперсией НХ-5 и раствором хитозана в ацетатном буфере (pH 5) за 24 ч до инокуляции патогеном *C. sativus* (4000 спор/мл). В каждом варианте опыта использовали 100 проростков. В контроле растения обрабатывали водой. Интенсивность развития болезни оценивали на 4 сутки после заражения по степени поражения площади листа в процентах. Элиситорную активность исследуемых образцов оценивали по пораженности листьев растений патогеном по отношению к контролю.

Все биологические опыты проводили в 3-кратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием методов описательной статистики (на основе стандартных ошибок средних ±SEM). Уровень различий между средними значениями определяли по критерию наименьшей существенной разницы (НСР) при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среди многообразия способов получения наночастиц хитозана [27–29] метод дробного осаждения раствора хитозана щелочью выгодно отличался отсутствием побочных химических процессов и методической простотой образования наночастиц хитозана, что делает этот способ наиболее перспективным для использования в растениеводстве [30, 31].

Особенностью получения наночастиц хитозана методом дробного осаждения раствора хитозана щелочью является большая длительность процесса образования наноструктурированной формы, что обусловлено постепенным ростом значения pH в системе (начальный pH 3.4) по мере добавления щелочи. При pH, близком к 8, весь полимер в виде гелеобразной массы оседал на дно. Осадок, промытый до нейтрального pH и ресуспендированный в деионизированной воде (pH 6.5), представлял собой дисперсию НХ.

Известно, что водная среда с pH 5 не обладает цитотоксичностью и может быть использована в растениеводстве [7]. Было сделано предположение, что если процесс закончить при pH 5, то образующаяся дисперсия будет представлять собой смесь агрегатов из макромолекул и уже частично сформированной наноструктурированной формы хитозана (дисперсия НХ-5). Методом

Таблица 1. Фунгистатическая активность дисперсий НХ и дисперсий НХ-5 при ингибировании роста мицелия гриба *A. solani* (концентрация образцов 200 мкг/мл по хитозану)

М, кДа	Образец	Ингибирование роста мицелия *A. solani*, %	
		3 сут	5 сут
14	Дисперсия НХ	17.5	33.3
	Дисперсия НХ-5	46.0	57.2
60	Дисперсия НХ	18.0	28.9
	Дисперсия НХ-5	47.5	57.7
$НСР_{0.05}$	–	3.5	3.0

Таблица 2. Фунгистатическая активность дисперсий НХ-5 с разной молекулярной массой (ММ) по отношению к аскомицету *C. sativus*

ММ, кДа	Хитозана, мкг/мл	Ингибирование роста мицелия *C. sativus*, %	
		3 сут	5 сут
6.5	50	27.5	28.6
	120	32.5	47.6
	300	57.5	71.4
14	50	15.0	29.8
	120	55.0	45.2
	300	55.0	76.1
60	50	17.0	30.9
	120	32.5	44.0
	300	57.0	69.7
$НСР_{0.05}$	–	4.5	3.2

Таблица 3. Влияние обработки растений пшеницы дисперсиями НХ, НХ-5 и раствором хитозана на развитие темно-бурой пятнистости

Образец	Концентрация,%	Пораженность листьев,%
Контроль	–	50
Дисперсия НХ	0.04	35
	0.01	40
Дисперсия НХ-5	0.04	20
	0.01	25
	0.004	45
Раствор хитозана (ацетатный буфер, pH 5)	0.04	45
	0.01	50
	0.004	50
НСР 0.05	–	4.0

атомно-силовой микроскопия путем анализа полученных изображений установлено, что в дисперсиях НХ присутствуют только плотные сплошные частицы, размер которых находился в диапазоне 5–25 нм [25]. Дисперсии НХ-5 имели в своем составе гелеобразные мягкие частицы с диаметром ~100 нм, представляющие собой агрегаты макромолекул хитозана, несущие частично положительный заряд, и наночастицы хитозана, уже образовавшиеся в дисперсии до pH 5. Можно предположить, что дисперсии НХ, приготовленные в деионизированной воде (pH 6.5), будут обладать биологической активностью благодаря наличию наноразмерных частиц с большой удельной поверхностью. Для дисперсий НХ-5, имеющих наряду с наночастицами еще и агрегаты макромолекул хитозана, которые при pH 5 несут положительный заряд, можно ожидать усиления их биологического действия.

Таким образом, для биологических испытаний были использованы два типа дисперсий НХ с разной молекулярной массой (дисперсии НХ и дисперсии НХ-5), различающиеся условиями их приготовления.

Результаты изучения активности полученных дисперсий в отношении фитопатогенных микроорганизмов представлены в табл. 1 и 2. Методом агаровых блоков проведена сравнительная оценка прямого действия дисперсий НХ и дисперсий НХ-5 на линейный рост мицелия гриба *A. solani* (табл. 1).

Установлено, что дисперсии НХ-5 характеризовались более высокой фунгистатической активностью по сравнению с дисперсиями НХ. При этом видно, что фунгистатические свойства дисперсий обоих типов не зависят от молекулярной массы хитозана. Подобные результаты для дисперсий НХ были получены ранее исследователями, изучавшими ингибирующую активность дисперсий НХ в отношении различных грибов: *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger* [32, 33].

Методом агаровых блоков экспериментально подтверждена высокая фунгистатическая активность дисперсий НХ-5 по отношению к аскомицету *C. sativus* и установлена концентрационная зависимость (табл. 2).

Таким образом, исследованные в работе дисперсии нанохитозана обладали фунгистатической активностью, при этом независимо от молекулярной массы хитозана дисперсии НХ-5 имели явное превосходство перед дисперсиями НХ.

Изучение элиситорной активности дисперсий НХ и НХ-5, полученных при использовании хитозана с молекулярной массой 60 кДа, проведено путем оценки способности дисперсий индуцировать устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости, возбудитель *C. sativus* (табл. 3).

Дисперсии НХ-5 и дисперсии НХ показали хорошую элиситорную активность, при этом дисперсия НХ-5 характеризовалась значительным иммуномодулирующим действием по сравнению с дисперсией НХ. Вполне вероятно, что причина преимущества дисперсии НХ-5 кроется в его составе, сочетающем наночастицы (компактизованные макромолекулы хитозана) и ассоциаты свободных макромолекул хитозана. Последние представляют собой рыхлые с большой подвижностью частицы, у которых на поверхности есть доступность к функциональным аминогруппам.

Преимущество дисперсии НХ-5 наблюдалось и при ее сравнении с раствором хитозана.

Из данных табл. 3 видно, что предобработка растений пшеницы дисперсией НХ-5 в концентрации 0.01% в два раза снижала пораженность листьев темно-бурой пятнистостью, в то время как раствор хитозана в той же концентрации практически не влиял на развитие болезни. Таким образом, предположение об усилении биологического действия дисперсий НХ-5, имеющих в своем составе наряду с наночастицами еще и агрегаты макромолекул хитозана, которые несут положительный заряд, подтвердилось.

В заключение необходимо отметить, что изученные дисперсии могут рассматриваться в качестве эффективных натуральных антимикробных

препаратов, обладающих индуцирующей активностью. Простота метода их получения, особенно дисперсии НХ-5, отсутствие других биологически активных компонентов в системах, кроме самого хитозана, являются основными преимуществами данного подхода, который полностью соответствует концепции “зеленой химии”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Данная работа выполнена за счет средств бюджета института (ВИЗР). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Варламов В. П., Ильина А. В., Шагдарова Б. Ц., Луньков А. П., Мысякина И. С.* // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
2. *Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K.* // Int. J. Mol. Sci. 2020.V. 21. № 2. P. 487. https://doi.org/10.3390/ijms21020487
3. *Saharan V., Pal A.* // Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection. Springer Briefs in Plant Science. Springer New Delhy, 2016. 55 p. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3601-6
4. *Варламов В. П., Немцев С. В., Тихонов В. Е.* Хитин и хитозан: природа, получение и применение. М.: Российское Хитиновое общество, 2010. 292 с.
5. *El Hadrami A., Adam L. R., El Hadrami I., Daayf F.* // Marine Drugs. 2010. V. 8. № . 4. P. 968–987. https://doi.org/10.3390/md8040968
6. *Badawy M. E., Rabea E. I.* // Int. J. Carbohydrate Chemistry. 2011. P. 1–29. https://doi.org/10.1155/2011/460381
7. *Тютерев С. Л.* Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. СПб: ВИЗР, 2014. 212 с.
8. *Kulikov S. N., Tikhonov V. E., Blagodatskikh I. V., Bezrodnykh E., Lopatin S., Khayrullin R. et al.* // Carbohydrate Polymers 2012. V. 87. P. 545–550. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.017
9. *Mourya V. K., Inamdar N. N.* // Reactive & Functional Polymers, 2008. V. 68. P. 1013–1051.
10. *Ильина А.В.* // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. 2010. № 2. С. 70–75.
11. *Choudhary M. K., Saharan V.* // International Journal of Chemical Studies. 2017. V. 5. № 4. P. 1489–1494.
12. *Hendrickson C., Garett H., Bunderson L.* // Agri Res. & Tech.: Open Access J. 2017. V. 11. № . 1. P. 555803. https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.11.555803
13. *Bandara S., Du H., Carson L.,* Bradford *D.* // Nanomaterials. 2020. V. 10. P. 1–32. https://doi.org/10.3390/nano10101903
14. *Kumaraswamy R. V., Kumari S., Choudhary R. C., Pal A., Raliya R., Biswas P., Saharan V.* // Int. J. Boil. Macromol. 2018. V. 113. P. 494–506. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12496-0_5
15. *Eshghi S., Hashemi M., Mohammadi A., Badii F., Mohammadhoseini Z., Ahmadi K.* // Food Bioprocess Technol. 2014. V. 7. № 8. P. 2397–2409. https://doi.org/10.1007/s11947-014-1281-2
16. *Shukla S. K., Mishra A. K., Arotiba O. A., Mamba B. B.* // Int. J. Biol. Macromol. 2013. V. 59. P. 46–58. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043
17. *Khot L. R., Sankaran S., Maja J.,* Ehsani *R.* // Crop. Protection. 2012. V. 35. P. 64–70. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007
18. *Ing L. Y., Zin N. M., A., Katas H.* // Int. J. Biomater. 2012. V. 1. P. 2–9. https://doi.org/10.1155/2012/632698
19. *Abdeltwab W. M., Abdelaliem Y. F., Metry W. A., Eldeghedy M.* // J. Adv. Lab. Res. Biol. 2019. V. 10. P. 8–15.
20. *Oh J.-W., Chun S. C., Chandrasekaran M.* // Agronomy. 2019. V. 9. P. 21. https://doi.org/10.3390/agronomy9010021
21. *Chandra S., Chakraborty N., Dasgupta A., Sarkar J., Panda K., Acharya K.* // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 1–14. https://doi.org/10.1038/srep15195
22. *Sathiyabama M., Manikandan A.* // Carbohydrate Polymers. 2016. V. 154. P. 241–246. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.089
23. *Siddaiah C. N., Satyanarayana N. R., Mudili V., Gupta V. K., Kalagatur N. K., Satyavati T. et al.* // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 2485. https://doi.org/10.1038/s41598–017–19016-z
24. *Власов П. С., Киселев А. А., Домнина Н. С., Попова Э. В.,* Тютерев *С. Л.* // Журнал прикладной химии. 2009. № 9. С. 1571. https://doi.org/10.1134/S1070427209090298
25. *Popova E. V., Domnina N. S., Zorin I. M., Lezov A. A., Novikova I. I., Krasnobaeva I. L.* // Nanobiotechnology Reports. 2023. V. 18. № 2. P. 238–246. https://doi.org/10.1134/s2635167623700088
26. Методические рекомендации по испытанию химических веществ на фунгицидную активность / Под ред. Е. И. Андреева, В. С. Картомышева. М.: НИИТЭХИМ, 1990. 52 с.
27. *Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bellich B., Cesàro A.* // Int. J. Pharm. 2013. V. 455. P. 219. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034
28. *Nugraheni P. S., Soeriyadi A. H., Ustadi U., Sediawan W. B., Budhijanto W.* // J. Eng. Technol. Sci. 2019. V. 51. № 3. P. 430. https://doi.org/10.5614/j.eng.technol.sci.2019.51.3.9

29. *Попова Э. В., Зорин И. М., Домнина Н. С., Новикова И. И., Краснобаева И. Л.* // Журнал общей химии. 2020. Т. 90. № 7. С. 1124–1132. https://doi.org/10.31857/s0044460x20070173

30. *Купреев Н. И. Кузнецов В. А.* Способ получения наночастиц низкомолекулярного хитозана. Пат. № 2428432 (Россия). 2011.

31. *Милушева Р. Ю., Рашидова С. Ш.* // Высокомол. соед. Серия С. 2017. Т. 59. № 1. С. 33. https://doi.org/10.7868/S2308114717010058

32. *Ing L. Y., Zin N. M., Sarwar A., Katas H.* // Int. J. Biomater. 2012. V. 1. P. 1–9. https://doi.org/10.1155/2012/632698

33. *Abdeltwab W. M., Abdelaliem Y. F., Metry W. A., Eldeghedy M.* // J. Adv. Lab. Res. Biol. 2019. V. 10. № 1. P. 8–15.

Biological Activity of Chitosan Nanoparticle Dispersions Produced by Fractional Precipitation

E. V. Popova[a, *], N. S. Domnina[b], I. I. Novikova[a], N. M. Kovalenko[a], I. L. Krasnobaeva[a, **], and I. M. Zorin[b]

[a]*All-Russian Research Institute for Plant Protection, Pushkin, 196608 Russia*
[b]*St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*
**e-mail: elzavpopova@mail.ru*
***e-mail: krasnobaeva08@mail.ru*

An assessment was made of the antifungal and immunomodulatory activity of dispersions of chitosan nanoparticles obtained by fractional precipitation at pH 5.0 and pH 7.5 using chitosan of different molecular weights. The dispersion of nanoparticles obtained at pH 5 has increased fungistatic activity against *C. sativus* and *A. solani*, due to the higher availability of amino groups in looser nanoparticles. This dispersion showed immunostimulating activity, increasing the resistance of wheat to dark brown spot. It was also established that the elicitor activity of dispersions of chitosan nanoparticles is significantly higher than the activity of solutions of the original polymer.

Keywords: chitosan, nanochitosan, antifungal, elicitor activities, *Alternaria solani*, *Cohliobolus sativus*, wheat

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 183–192

УДК 571.27:632.4:632.938:633.11

ВЛИЯНИЕ КОНЪЮГАТОВ ХИТОЗАНА С ОКСИКОРИЧНЫМИ КИСЛОТАМИ И БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* НА АКТИВНОСТЬ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К *Phytophthora infestans*

© 2024 г.
Л. Г. Яруллина[1, 2, *], Г. Ф. Бурханова[1], В. О. Цветков[2], Е. А. Черепанова[1], А. В. Сорокань[1], Е. А. Заикина[1], И. С. Марданшин[3], И. Я. Фаткуллин[1], И. В. Максимов[1], Ж. Н. Калацкая[4], Н. А. Еловская[4], Е. И. Рыбинская[4]

[1]*Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия*

[2]*Уфимский университет науки и технологий, Уфа, 450076 Россия*

[3]*Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия*

[4]*Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Беларусь*

**e-mail: yarullina@bk.ru*

Поступила в редакцию 15.09.2023 г.
После доработки 30.10.2023 г.
Принята к публикации 05.11.2023 г.

Исследовали влияние конъюгатов хитозана с кофейной (**ХКК**) и феруловой (**ХФК**) кислотами в сочетании с бактериями *Bacillus subtilis* на транскрипционную активность генов PR-белков и изменение протеома у растений картофеля при инфицировании *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Показано, что опрыскивание растений, выращенных из мини-клубней сорта Удача, растворами композитов ХКК и ХФК и суспензией *B. subtilis* штаммов 26Д и 11 ВМ приводило к снижению степени развития возбудителя фитофтороза на листьях картофеля при всех вариантах обработки. Максимальный защитный эффект проявлялся при обработке растений бактериями *B. subtilis* штамм 26Д в сочетании с конъюгатами хитозана и оксикоричных кислот. Механизмы повышения устойчивости растений картофеля к *P. infestans* были связаны с активацией транскрипционной активности генов, кодирующих основной защитный белок (PR-1), хитиназы (PR-3), тауматинподобного белка (PR-5), ингибитора протеаз (PR-6), пероксидазы (PR-9) и рибонуклеазы (PR-10). Активация экспрессии маркерных генов системной приобретенной устойчивости и индуцированной системной устойчивости под влиянием совместной обработки свидетельствовала о синергетическом развитии защитных реакций в растениях картофеля в данном варианте. Методом двумерного электрофореза белков листьев *S. tuberosum* с последующим MALDI-TOF-анализом идентифицировано 12 белков, состав которых в листьях различался в зависимости от варианта опыта. Во всех вариантах наблюдали подавление активности серин-треониновой протеин-фосфатазы, отражающее развитие реакции сверхчувствительности (СВЧ-реакции). Различные варианты опыта формировали слабо выраженные кластеры, что свидетельствовало о множественных механизмах регуляции синтеза защитных белков, вовлеченных в реакцию, на обработку бактериями, конъюгатами хитозана и заражение *P. infestans*.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Bacillus subtilis*, *Phytophthora infestans*, конъюгаты хитозана, кофейная и феруловая кислоты, экспрессия генов, PR-белки, протеом, индуцированная устойчивость

DOI: 10.31857/S0555109924020088 **EDN:** FZZZBV

В настоящее время в растениеводстве широко используются биопестициды на основе эндофитных бактерий рода *Bacillus,* способных не только подавлять развитие патогенов, но и также стимулировать рост растений и их устойчивость к стрессам биотической и абиотической природы [1]. К недостаткам биопестицидов можно отнести сравнительно низкую скорость уничтожения патогенов и высокую чувствительность к неблагоприятным факторам окружающей среды. Так, Cry-белки, продуцируемые бактериями *B. thuringiensis*, чувствительны к различным абиотическим факторам: осадки, pH и температура почвы, инсоляция и влажность [2]. В этой связи весьма

актуальным становится повышение эффективности микробиологических препаратов для защиты продовольственных культур от комплекса биотических и абиотических факторов среды, что может быть достигнуто созданием препаратов, в которых штамм бактерий дополнен биологически активными веществами [3, 4].

Хитозан и его производные являются элиситорами иммунитета растений, которые часто используются для повышения биологической активности биопрепаратов [5, 6]. Показано, что добавление хитозана к биопрепаратам повышало их эффективность в защите овощных культур от мучнистой росы, а добавление хитина к бактериям рода *Bacillus* повышало устойчивость растений хлопка к вилту [7]. Синергетический эффект хитозанов и бактерий обусловлен синтезом штаммами бактерий эндохитиназы, гидролизирующей хитин с образованием олигосахаридов, стимулирующих рост растений и их защитный потенциал [8, 9]. Путем химической модификации хитозана можно получать производные с повышенными антимикробными свойствами, ростстимулирующей и антиоксидантной активностями [10, 11]. Одним из направлений химической модификации хитозана является включение в его состав фенольных соединений, таких как оксикоричные кислоты, которые являются предшественниками большинства фенольных соединений и регулируют защитные ответы растений [12].

Возбудитель фитофтозоза — оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary — один из основных возбудителей эпифитотий в посадках картофеля. Современная стратегия комплексной защиты продовольственных культур от широкого круга возбудителей болезней и абиотических стрессов основывается на применении биопрепаратов в сочетании с природными иммуностимуляторами. В связи с этим нанокомпозиты хитозана имеют большой потенциал для расширения спектра действия биопестицидов нового поколения благодаря своей способности индуцировать защитные реакции в растительных тканях. Для этого необходимы сведения о механизмах формирования защитных реакций у растений при совместном их применении.

Цель работы — исследование влияния конъюгатов хитозана с кофейной (**КК**) и феруловой кислотами (**ФК**) и их комплексов с бактериями *Bacillus subtilis* на транскрипционную активность генов PR-белков, синтез пролина и изменение протеома растений картофеля при инфицировании *P. infestans*.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В опытах использовали растения картофеля *Solanum tuberosum* (Чишминская опытная станция Башкирского НИИ сельского хозяйства, Уфа, Россия), выращенные из мини-клубней сорта Удача. Клубни высаживали в емкости с грунтом “TerraVita” (“Норд Палп”, Россия, торф верховой разной степени разложения, очищенный речной песок, перлит, комплексные минеральные удобрения, биогумус, pH 6.0–6.5) на глубину 3–4 см. Растения выращивали на светоплощадке с фотопериодом 16 ч (освещенность 8000–10000 люкс) при температуре 20–22°C.

Бактерии *B. subtilis* штаммы 26Д и 11 ВМ из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Уфа, Россия) культивировали в среде LB (Lysogeny Broth) в течение 24 ч, затем суспензию разбавляли дистиллированной водой до концентрации 10^8 кл./мл.

Для заражения растений использовали зооспоры оомицета *P. infestans* из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Уфа, Россия). Патоген выращивали на картофельном агаре с декстрозой в течение 7 сут после повторного выделения из инфицированных мини-клубней картофеля для восстановления агрессивности патогена. Поверхность колоний изолята *P. infestans* заливали дистиллированной водой и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Концентрацию спорангиев оценивали с помощью камеры Фукса–Розенталя, суспензию спор разводили до титра 1×10^5 спор/мл.

Получение коньюгатов хитозана с оксикоричными кислотами. Конъюгат хитозана с КК и ФК получали карбодиимидным методом по методике, описанной в работе [13]. Для синтеза конъюгатов использовали хитозан с молекулярной массой (**ММ**) ~30 кДа, степенью деацетилирования 98.3% и степенью полимеризации ~186 (“Glentham Life Sciences”, Великобритания), КК (ММ = 180.16 г/моль, “Sigma-Aldrich”, США) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (**EDC**, “Sigma-Aldrich”). Синтез конъюгата проводили при соотношении Хит : КК и Хит : ФК = 5 : 1, EDC использовали в трехкратном мольном избытке по отношению к КК и ФК.

Содержание КК и ФК в синтезированном конъюгате определяли спектрофотометрически, для чего получали спектр поглощения конъюгата в области 200–400 нм и рассчитывали содержание КК и ФК по предварительно построенному калибровочному графику. Степень пришивки кофейной и феруловой кислот к хитозану составила 5.0 ± 0.6% или 53.8 ± 7.2 мкг/мг хитозана.

Обработка растений. На 15 сут после прорастания растения обрабатывали растворами конъюгатов хитозана с кофейной (**ХКК**, 0.30 мг/мл) и феруловой (**ХФК**, 0.25 мг/мл) кислотами, суспензией бактерий *B. subtilis* штаммов 26Д или 11 ВМ (10^8 кл./мл), смесью растворов ХКК или ХФК с бактериями

соответствующих штаммов (1 : 1) из расчета 5 мл на 1 растение [7]. В контроле 1 растение опрыскивали 5 мл дистиллированной воды.Через 3 сут после инокуляции бактериями растения опрыскивали 5 мл суспензией спор *P. infestans* (1×10^5 спор/мл). Через 72 ч в листьях определяли содержание H_2O_2 и пролина. Часть листьев каждого растения замораживали в жидком азоте для выделения РНК. О развитии болезни судили по проценту пораженной *P. infestans* площади от общей площади листовой пластинки (степень поражения, **СП**). Листья фотографировали, полученные изображения анализировали в компьютерной программе ImageJ (“NIH”, США). В качестве контрольных использовали растения, обработанные водой и не инфицированные фитофторой.

Определение содержания белка. Содержание белка в образцах определяли по методу Брэдфорда, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [14]. Поглощение измеряли при 595 нм.

Определение содержания пролина. Листья картофеля (250 мг) погружали в 2.5 мл дистиллированной воды и обрабатывали, как описано в работе [15]. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на оборудовании En-Spire (“Perkin Elmer”, США) при длине волны 522 нм.

Выделение РНК и проведение ПЦР в режиме реального времени. Тотальную РНК из растений выделяли с помощью реактива Лира® по протоколу производителя (“Биолабмикс”, Россия) на 3 сутки после заражения. Синтез первой цепи кДНК и процедуру в реальном времени проводили, как описано ранее [15]. Экспрессия генов была показана как кратное изменение, нормализованное к транскрипции эталонного гена StAct, кодирующего актин картофеля. Применяли оборудование и программное обеспечение iCycler iQ5 Real-Time Detection System 181 (“BioRad”, США). Праймеры, использованные для ПЦР, показаны в табл. 1. Эффективность праймеров оценивали с помощью серии 10-кратных разведений кДНК.

Двумерный электрофорез. 450 мг листьев гомогенизировали в жидком азоте, ресуспендировали в 1 мл буферного раствора (0.7 М сахароза, 0.5 Hepes-KOH, pH 7.5, 0.1 М KCl, 2% меркаптоэтанол, 1 мМ этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N, N, N’, N’-тетрауксусная кислота (**ЭГТА**), 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (**ФМСФ**), 0.1 мМ ортованадат натрия) и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. Белки экстрагировали фенольным раствором по методике, описанной в работе [16]. К 1 мл фенола, насыщенного трис-HCl, добавляли 1 мл образца белка, полученную смесь инкубировали при –20°С в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 3000 *g*. Белки из фенольной фазы осаждали четырехкратным объемом 0.1 М ацетата аммония в этаноле при –20°С в течение 10 ч.

Полученный осадок трижды промывали ацетатом аммония и растворяли в лизис-буфере (8 М мочевина, 2 М тиомочевина, 1% 3-[(3-холамидопропил)диметиламмонио]-1-пропансульфонат (**ЧАПС**), 30 мМ дитиотреитол (**ДТТ**), 20 мМ Трис, 0.3%-ный раствор амфолитов).

Изоэлектрическое фокусирование белков проводили на приборе Protean IEF (“Bio-Rad”, США). Для разделения белков по изоэлектрической точке использовали готовые 7-сантиметровые стрипы (“Bio-Rad”, США), диапазон pH 3–10. Перед фокусировкой проводили пассивную регидратацию в течение 12 ч при 20°С. Фокусировку проводили при напряжении 4000 В (20000 В ч) в течение 22 ч, затем напряжение поддерживали на уровне 500 В до конца процесса. После изоэлектрического фокусирования полоски выдерживали в течение 15 мин последовательно в растворах 2%-ного ДТТ и 2.5%-ного йодацетамида в буферных растворах с 25% глицерина, а затем промывали в 25 мМ трис-глициновом буфере, pH 8.3.

Электрофорез проводили в 10%-ном ПААГ с Na-ДДС. Полоски и белки-маркеры на фильтровальной бумаге помещали на полиакриламидный гель и проливали 1%-ным раствором агарозы в трис-глициновом буферном растворе. Электрофорез проводили при напряжении 90–120 В, гели стабилизировали в 50%-ном этаноле в течение 10 мин, затем окрашивали 0.1%-ным раствором

Таблица 1. Праймеры, используемые в ПЦР для исследования активности изучаемых генов

Продукт	Ген	GenBank, номер	Последовательность (5′–3′)	
			прямой праймер	обратный праймер
Актин	StAct	X55749	gat-ggt-gtc-agc-cac-ac	att-cca-gca-gct-tcc-att-cc
PR1	StPR1	AY050221	tgg-gtg-gtg-gtt-cat-ttc-ttg-t	cat-tta-att-cct-tac-aca-tca-taa-g
Хитиназа, PR3	StPR3	U49970	ttc-tgg-atg-aca-gca-cag-gat	ggc-gtc-cat-tgc-cca-at
Тауматин-подобный белок, PR5	StPR5	AY737317	ccc-gtt-tga-cat-tga-cct-ttg	cga-ata-cgg-tgg-aac-atg-ga
Ингибитор протеиназы, PR6	StPR6	JX683427	ggg-aaa-gaa-tat-gct-caa-gtt-at	aat-tct-cca-tca-tct-tcc-act-g
Пероксидаза, PR9	StPR9	M21334	gta-atc-ctg-ccg-cac-aac-t	gca-gca-aaa-tct-cca-agg-aa
Рибонуклеаза, PR10	StPR10	AF500589	ctc-gct-aac-cct-tct-gtc-tat-g	caa-cac-gtc-ctg-atc-atc-tct-c
Метилтрансфераза	StMT	XM_006356514	ggc-aat-gga-cat-taa-ccg	tca-aga-aga-ggc-aaa-gca-g
Пролин-карбоксилат синтаза	StPCS	XM015308529	tta-aag-agg-acg-gag-ctt-gc	cag-tgc-atc-agg-tcg-tga-ct

Кумасси G-250. Изображения гелей анализировали в компьютерной программе ImageJ (“NIH”, США).

Масс-спектрометрия. Идентификацию белков проводили на масс-спектрометре MALDI Bruker Ultraflex II (Германия). Триптический гидролиз белка в геле проводили в течение 18 ч при 37°C, останавливая добавлением 7 мкл 0.7%-ного раствора трифторуксусной кислоты. Для масс-спектрметрического анализа непосредственно на мишени масс-спектрометра смешивали 0.5 мкл раствора гидролизованного образца и 0.5 мкл 10 мг/мл дигидроксибензойной кислоты в 50%-ном ацетонитриле и 0.7%-ной трифторуксусной кислоты. Масс-спектры регистрировали в рефлекторном режиме суммированием сигналов, получаемых при 1000 лазерных импульсах.

При необходимости и возможности регистрировали спектры фрагментации отдельных пептидов (MS/MS) с использованием тандемной масс-спектрометрии LIFT. Точность измерения моноизотопных масс — не хуже 70 м.д., точность измерения масс фрагментов — не хуже 1.5 Да. Идентификацию белков проводили с использованием сервиса MASCOT в базе данных белковых последовательностей SWISS-PROT и локального сервиса MASCOT с использованием данных, относящихся к изучаемым таксонам, депонированным в банк данных GenBank NCBI.

Статистическая обработка. Эксперименты включали 5 биологических повторностей для биохимических показателей и 15 — для транскрипционной активности. На гистограммах показаны выборочные средние и их 95%-ные доверительные интервалы. Различия исследуемых параметров анализировали с помощью теста Краскела–Уоллиса в программе Statistica 8 (“Statsoft”, США). Для определения степени сходства спектров белков листьев в различных вариантах опыта проводили кластерный анализ данных о содержании отдельных белков (евклидово расстояние, метод объединения групп — UPGMA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние композитов хитозана с оксикоричными кислотами и бактерий *Bacillus subtilis* на устойчивость листьев картофеля к инфицированию *P. infestans* и содержание пролина. Анализ степени пораженности листьев картофеля сорта Удача возбудителем фитофтороза выявил снижение скорости роста *P. infestans* при обработке растений конъюгатами ХКК и ХФК, а также при их совместном применении с различными штаммами бактерий *Bacillus subtilis* (рис. 1). Максимальное снижение степени пораженности листьев *P. infestans* выявлено в вариантах с предобработкой растений коньюгатом ХКК и при сочетании бактерий *B. subtilis* 26Д с ХФК, в два раза по сравнению с контролем.

Защитный эффект предобработки растений картофеля бактериями *B. subtilis* 11ВМ заметно уступал штамму *B. subtilis* 26Д, в том числе при сочетании бактерий с контюгатами ХКК и ХФК. При этом степень пораженности листьев *P. infestans* в вариантах *B. subtilis* 11ВМ + ХКК и *B. subtilis* 11ВМ + ХФК была достоверно ниже по сравнению с обработкой только *B. subtilis* 11ВМ.

Известно, что колонизация полезными микроорганизмами вызывает физиологическое состояние растения-хозяина, называемое праймингом. “Праймированный” статус растения позволяет реализовывать более сильные и быстрые защитные реакции против последующей инвазии патогенов, что проявляется как общий признак системной устойчивости, индуцируемой полезными микроорганизмами [17].

Хитин, хитозан и их олигомеры являются активными элиситорами иммунитета растений [18]. Оксикоричные кислоты под воздействием стрессовых факторов различной природы могут включаться в фенилпропаноидный путь, изменяя направление синтеза собственных производных [19], усиливая образование фенольных соединений, участвующих в механизмах повышения устойчивости растений [20]. Можно предположить, что совместная обработка коньюгатами хитозана с оксикоричными кислотами и бактериями *B. subtilis* способствует формированию более ранних и интенсивных защитных реакций при контакте с патогеном.

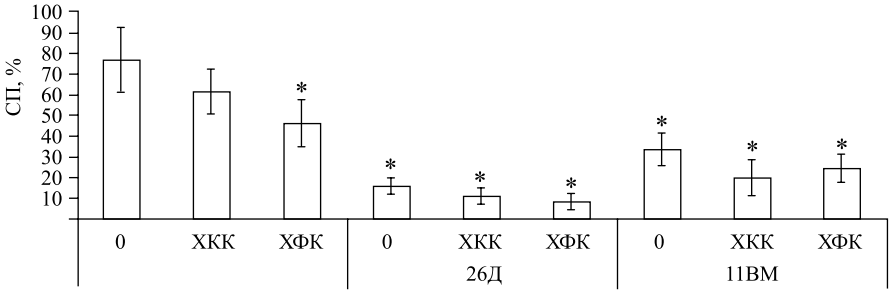

Рис. 1. Влияние конъюгатов ХКК и ХФК в композициях с *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ на пораженность листьев картофеля *P. infestans* на 10 сутки после инокуляции. Звездочкой отмечены значения, значимо отличающиеся от контрольных значений по критерию Краскела–Уоллиса.

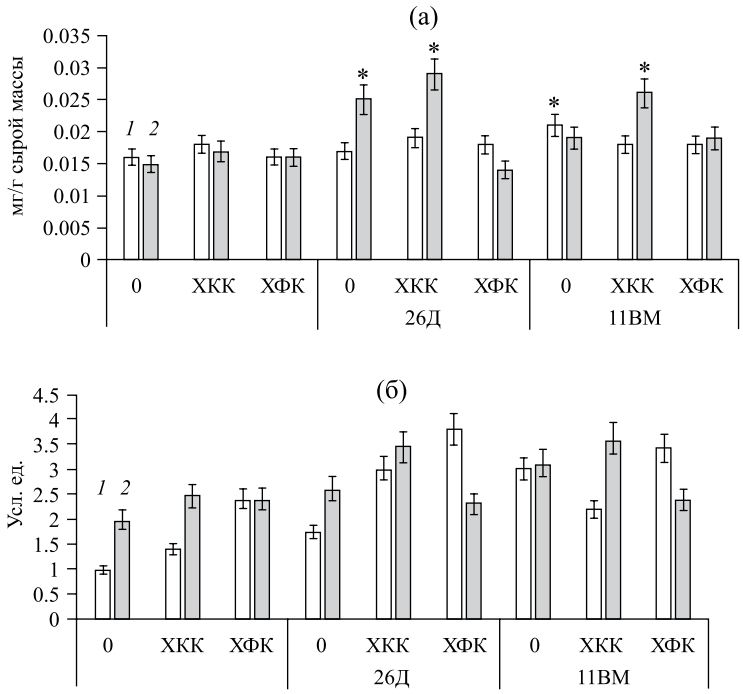

Рис. 2. Влияние конъюгатов ХКК и ХФК в композициях с *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ на содержание пролина (а) и транскрипционную активность гена пирролин-5-карбоксилат синтазы (б) в растениях картофеля на 3 сутки после инокуляции *P. infestans*: *1* — контроль, *2* — заражение *P. infestans*. Звездочкой отмечены значения, значимо отличающиеся от контрольных значений по критерию Краскела–Уоллиса.

Известно, что самым ранним ответом растительного организма на атаку патогенов является генерация АФК и каскад последующих защитных реакций. В то же время длительная генерация АФК в растительных тканях приводит к их гибели. Наши исследования выявили антистрессовый эффект обработки *B. subtilis* в сочетании с ХКК на растениях картофеля, зараженных *P. infestans* (рис. 2а). Накопление пролина коррелировало с повышением транскрипционной активности гена пирролин-5-карбоксилат синтазой (**P5CS**) (рис. 2б) Повышение содержания пролина при стрессе связывают с активацией его синтеза, катализируемого P5CS и пирролин-5-карбоксилат редуктазой (**P5CR**) [21].

Синтез пролина может индуцироваться экзогенными сигнальными молекулами, брассиностероидами [22], салициловой кислотой [23], хитозаном [24]. Защитное действие пролина обусловлено его участием в стабилизации мембран, структуры белковых молекул и снижении уровня АФК. Кроме того, пролин задействован в регуляции многих клеточных процессов, является одним из индикаторов активации системной защиты растений, выполняя сигнальную функцию при взаимодействии растений с патогенами [25].

Влияние композитов хитозана с оксикоричными кислотами и бактерий *B. subtilis* на транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при заражении *P. infestans*. Одним из механизмов защитного действия биопрепаратов на основе эндофитных бактерий является усиление продукции АФК [26] и опосредованной индукции экспрессии генов PR-белков [27]. Как видно на рис. 3, обработка растений штаммами *B. subtilis* 26Д и 11ВМ не влияла на транскрипционную активность исследуемых генов у незараженных растений. Уровень транскрипции гена *StPR9*, кодирующего анионную пероксидазу, в отличие от *StPR1* и *StPR6*, повышался при инфицировании *P. infestans*. Обработка растений картофеля конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами стимулировала накопление транскриптов генов *StPR1*, *StPR3, StPR6* и *StPR9*, *StPR10*, но не влияла на транскрипцию гена *StPR5* и метилтрансферазы в листьях растений, инфицированных *P. infestans*.

В обработанных бактериями, особенно штаммом *B. subtilis* 26Д, и инфицированных растениях в несколько раз повышалась транскрипция генов *StPR1*, *StPR6* и *StPR9*, *StPR10* и метилтрансферазы. Обработка растений *B. subtilis* 26Д совместно с коньюгатами ХКК и ХФК достоверно повышала уровень транскриптов генов *StPR1*, *StPR3, StPR5*, *StPR6* и *StPR9*, *StPR10.* В варианте с обработкой растений картофеля штаммом *B. subtilis* 11ВМ совместно с коньюгатами хитозана и оксикоричных кислот при инфицировании *P. infestans* также усиливалась транскрипционная активность генов *StPR1*, *StPR3, StPR6 StPR9* и *StPR10*, но не изменялась транскрипция *StPR5.*

На растениях трахинии показано, что *B. subtilis* B26 вызывает увеличение активности метилтрансфераз, участвующих в поддержании и регуляции метилирования ДНК растения [28]. Это предполагает участие бактерий рода *Bacillus* в регуляции устойчивости растений на эпигенетическом уровне. В целом, устойчивость растения к тому или иному стрессовому фактору определяется экспрессией множества генов, кодирующих защитные белки.

Показано, что обработка растений бактериями *B. subtilis* способствует развитию жасмонат-зависимой индуцированной системной устойчивости (**ИСУ**), что подтверждается увеличением транскрипционной активности гена PR-6, который считается маркером формирования защитного ответа по данному пути [29]. При воздействии биотрофных патогенов и элиситоров формирование системной приобретенной устойчивости (**СПУ**) развивается по салицилат-зависимому сигнальному пути, включая экспрессию гена PR-1 (маркера СПУ) [30, 31]. Следует отметить, что в зараженных растениях, предварительно обработанных *B. subtilis* 26Д и 11ВМ совместно с композитами ХКК и ХФК, наблюдался высокий уровень транскрипционной активности генов основного антимикробного белка PR-1 и ингибитора протеазы PR-6. Возможно, в данном варианте обработки растений развитие устойчивости происходит синергетически, как по салицилат-, так и по жасмонат-зависимым путям. У инфицированных растений, обработанных *B. subtilis* 26Д в сочетании с ХФК, значительно повышалась транскрипционная активность генов хитиназы (PR-3), тауматин-подобного белка (PR-5) и пероксидазы (PR-9). Показано, что бактерии рода *Bacillus* вырабатывают в культуральную среду хитиназы и глюканазы, гидролизирующие хитин и пептидогликаны, которые являются важным компонентом клеточной стенки микроорганизмов, а также индуцируют образование других защитных соединений [32]. В ответ на заражение вирусами, грибами и бактериями в межклеточной жидкости растительных тканей происходит накопление

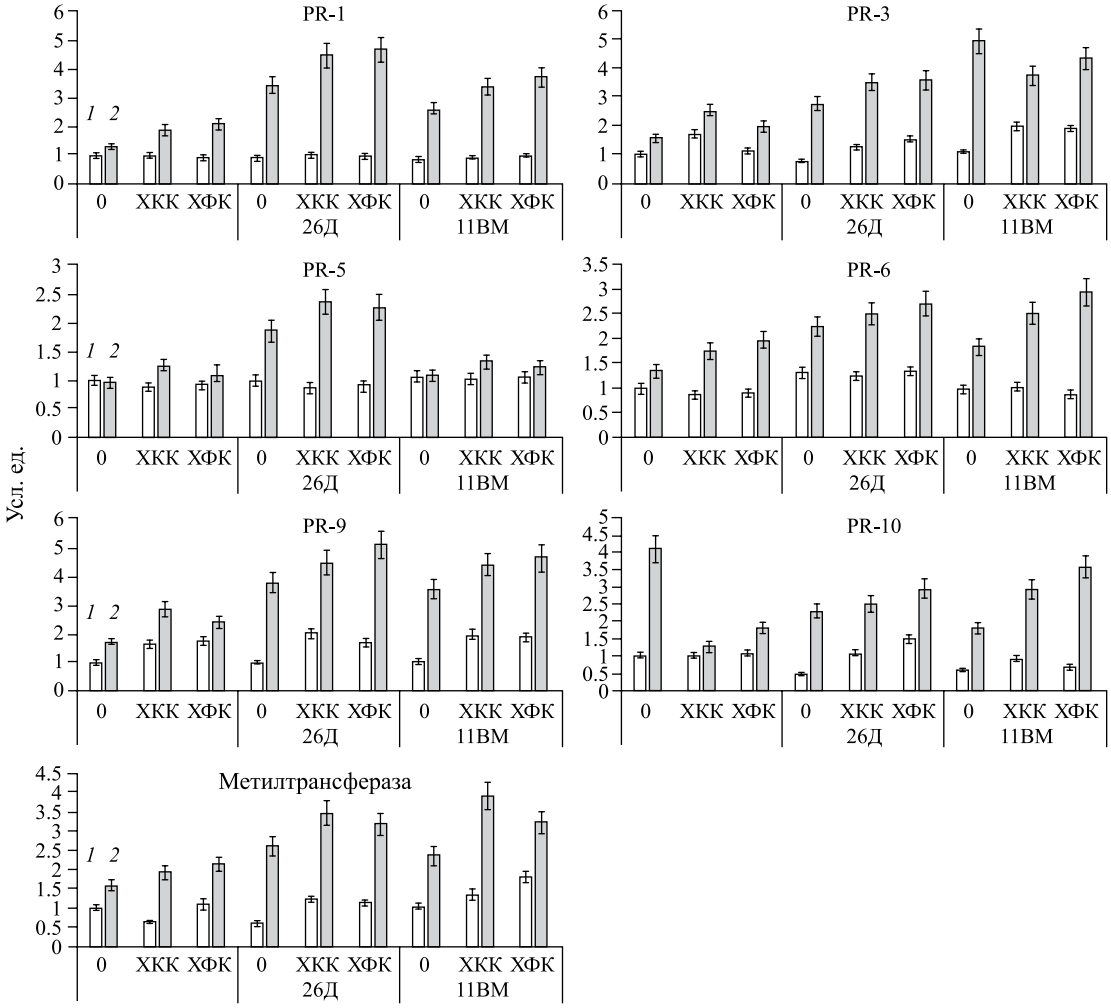

Рис. 3. Влияние конъюгатов ХКК и ХФК в композициях с *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ на транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля через 72 ч после инфицирования *P. infestans*: *1* — контроль, *2* — заражение *P. infestans*.

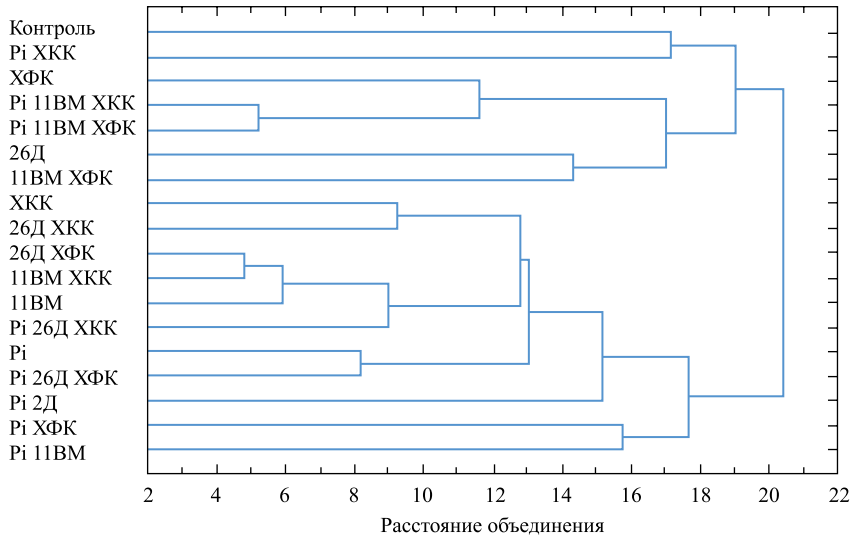

Рис. 4. Кластеризация вариантов опыта в соответствии с присутствием различных белков в листьях. “Pi” — заражение *P. infestans*.

в основном хитиназ третьего типа (PR-3). Основной защитный механизм белка PR-5 связан с увеличением проницаемости мембран патогенов [33].

В зараженных растениях, обработанных обоими штаммами *B. subtilis* в сочетании с ХКК, значительно повышалась экспрессия генов PR-9 и PR-10, что коррелировало с их устойчивостью. Известно, что пероксидазы растений класса III, входящих в семейство защитных белков семейства PR-9, участвуют в укреплении клеточных стенок за счет окислительных реакций, катализирующих процессы полимеризации фенольных соединений в лигнине клеточных стенок, повышая их устойчивость к разрушению фитопатогенами. Белки семейства PR10 могут функционировать в качестве фунгицидов, причем эта их способность, связанная с нуклеазной активностью, может проявляться как при прямом воздействии на патоген при проникновении внутрь клетки и разрушении клеточных РНК [34], так и за счет участия в реакции сверхчувствительности полностью [35]. Можно предположить, что индукция устойчивости растений, опосредованная рассматриваемыми штаммами *Bacillus*, может характеризоваться многогранным процессом прайминга, включающим экспрессию генов PR-белков и тонкую регуляцию окислительно-восстановительных процессов в растении [36].

Изменение протеома листьев *S. tuberosum* при обработке композитами хитозана с оксикоричными кислотами и бактериями *B. subtilis* при заражении *P. infestans*. Одним из подходов к выявлению изменений экспрессии генов в растениях под воздействием обработки биопрепаратами и инфицирования патогенами может служить исследование протеома растительных тканей. Методом двумерного электрофореза белков листьев *S. tuberosum* с последующим MALDI-TOF-анализом было идентифицировано 12 белков, наличие которых в листьях различалось в зависимости от варианта опыта (табл. 2, рис. 4).

Как видно из табл. 2 и рис. 4, обработка ХФК в зараженных растениях существенно изменяла спектр белков листьев по сравнению с контролем. Различные варианты опыта формируют слабо выраженные кластеры, что свидетельствует о множественных механизмах регуляции синтеза защитных белков, вовлеченных в реакцию на обработку бактериями, конъюгатами хитозана и заражение *P. infestans*.

Предобработка ХФК при заражении растений вызывала повышенное содержание в листьях белков oxygen-evolving enhancer protein 1, вовлеченного в генерацию АФК, и mitochondrial amidoxime reducing component 2. Известно, что окислительный взрыв является сигналом для реакции СВЧ, которая тесно связана с ответом растений на инфицирование патогеном. Имеются данные о взаимосвязи белка окислительного взрыва RPH1 с устойчивостью растений арабидопсиса к *Phytophthora brassicae* и картофеля к *P. infestans* [36]. Mitochondrial amidoxime reducing component 2 относится к ферментам электрон-транспортной цепи и катализирует реакции восстановления N-гидроксилированных соединений. Описана его защитная роль, заключающаяся в нейтрализации токсичных и мутагенных азотистых оснований [37, 38]. Белок mARK способен оказывать влияние на энергетические пути [38], также показано его участие в защите клеток от апоптотических эффектов [39]. Роль данного белка в реализации устойчивости растений в настоящее время не описана.

Во всех вариантах обработки наблюдалось пониженное содержание в листьях серин-треониновой протеинфосфатазы. Недавние исследования определяют протеинфосфатазу как важнейший

Таблица 2. Присутствие различных белков в листьях картофеля в различных вариантах опыта

№	Название белка по Uniprot	Контроль									*P. infestans*								
		H_2O			26Д			11ВМ			H_2O			26Д			11ВМ		
		0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК
1	Sesquiterpene synthase	–	–	–	11	–	–	–	–	5	–	–	–	–	–	–	–	–	3
2	Aminomethyltransferase, mitochondrial	6	–	–	4	–	–	2.4	3	–	–	–	0.9	6	–	–	2	–	0.4
3	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–	–	–	–	–	–
4	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3	–	–	6	7	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–
5	Mitochondrial amidoxime reducing component 2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–
6	Serine/threonine protein phosphatase	9	–	6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	–	–	4	2	–	–	3	–	8	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	–	2	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	–	3	11	8	3	16	13	13	–	13	–	4	6	12	9	6	15	14
10	Peptidyl-prolyl cis–trans isomerase	6	–	4	–	8	1	4	3	–	14	19	2	–	8	9	10	8	9
11	Putative ferredoxin-NADP reductase	–	14	–	2	13	9	12	8	–	17	3	4	12	15	12	–	4	–
12	Chorismate synthase.	–	8	–	–	12	11	12	11	–	4	–	10	–	14	5	18	–	–

Примечание: «–» — белок не детектирован.

компонент, который контролирует ответные реакции патогенеза у различных видов растений, опосредуя посттрансляционную регуляцию ферментов и сигнальных компонентов. Генетические, протеомные и метаболомные исследования подчеркнули универсальную природу протеинфосфатазы как регулятора передачи сигналов рецепторов и органелл, экспрессии генов, метаболических путей и гибели клеток, оказывающих существенное влияние на иммунитет растений [40]. Все известные пути развития СВЧ-реакции включают инактивацию серин-треониновых протеинфосфатаз. В наших экспериментах наблюдалось блокирование этого фермента, что, по-видимому, является проявлением развития СВЧ-реакции.

При обработке ХКК и ХФК происходило повышение митохондриальной сериновой гидроксиметилтрансферазы (**SHMT**), одного из ферментов дыхания растений, нейтрализующего последствия СВЧ-реакции [41]. Показана связь SHMT с уменьшением выраженности симптомов поражения биотрофами и некротрофами, а также повреждений клеток, вызываемых абиотическими стрессами. Известно, что SHMT взаимодействует с α- и β-субъединицами АТФ-синтазы, содержание которой в наших экспериментах также значительно повышалось при различных обработках. По современным представлениям, данные взаимодействия в конечном итоге приводят к минимизации производства АФК, в частности пероксида водорода, в хлоропластах и уменьшении степени их окислительного повреждения [41].

Таким образом, совместная обработка растений конъюгатами хитозана с КК и ФК и бактериальными штаммами *B. subtilis* 26Д и 11ВМ способствовала повышению устойчивости растений картофеля к возбудителю фитофтороза. Механизмы активации защитных систем картофеля были опосредованы стимулированием экспрессии генов, кодирующих защитные белки PR-1, PR-3, PR-5, PR-6, PR-9 и PR-10 и повышением синтеза пролина. Выявленная активация экспрессии генов PR-1 (маркер СПУ) и PR-6 (маркер ИСУ) у растений свидетельствуют о том, что развитие защитных реакций в растениях картофеля против возбудителя в данном варианте обработки протекает синергетически. Возможно, бактерии праймируют гены защитных белков, а композиты хитозана запускают их экспрессию. Механизм влияния ХКК и ХФК на формирование устойчивости к возбудителю фитофтороза определяется составом (полимер-антиоксидант) и структурой самого конъюгата. За счет полимерной матрицы, вероятно,

обеспечивается пролонгированное воздействие оксикоричных кислот на функциональное состояние растительной клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23–16–00139).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chandler D., Bailey A. S., Tatchell G. M., Davidson G., Greaves J., Grant W. P.* // Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci. 2011. V. 366. P. 1987–1998. https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390
2. *Kocięcka J., Liberacki D.* // Plants. 2021. V. 10. P. 1160. https://doi.org/10.3390/plants10061160
3. *Gonçalves C., Ferreira N., Lourenço L.* // Polymers. 2021. V. 13. P. 2466. https://doi.org/10.3390/polym13152466
4. *Aranaz I., Alcántara A. R., Civera M. C., Arias C., Elorza B., Heras Caballero A., Acosta N.* // Polymers. 2021. V. 13. P. 3256. https://doi.org/10.3390/polym13193256
5. *Новикова И. И., Попова Э. В., Краснобаева И. Л., Коваленко Н. М.* // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56. № 3. С. 511–522. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.511rus
6. *Kolesnikov L. E., Popova E. V., Novikova I. I., Priyatkin N. S., Arkhipov M. V., Kolesnikova Yu.R. et al.* // Agricultural Biology. 2019. V. 54. № 5. P. 1024–1040. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.1024
7. *Краснобаева И. Л., Коваленко Н. М., Попова Э. В.* // Вестник защиты растений. 2020. Т. 103. № 4. С. 233–240. https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-4-13272
8. *Ortiz-Rodríguez T., De La Fuente-Salcido N., Bideshi D. K., Salcedo-Hernández R., Barboza-Corona J. E.* // Lett. Appl. Microbiol. 2010. V. 51. P. 184–190.
9. *Saharan V., Pal A.* Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection. New Delhi, India: Springer, 2016. P. 33–41.
10. *Palazzini J., Reynoso A., Yerkovich N., Zachetti V., Ramírez M., Chulze S.* // Toxins. 2022. V. 14. P. 499. https://doi.org/10.3390/toxins14070499
11. *Ahmed A. S., Ezziyyani M.,* Sánchez C. P., *Candela M. E.* // Eur. J. Plant Pathol. 2003. V. 109. P. 633–637. https://doi.org/10.1023/A:1024734216814
12. *Brzezinska M.S., Kalwasińska A.,* Świątczak *J.,* Żero *K., Jankiewicz U.* // Microb. Pathog. 2020. V. 148. P. 104462. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104462
13. *Rajput V. D., Harish Singh R. K., Verma K. K., Sharma L., Quiroz-Figueroa F.R., Meena M., Gour V. S., Minkina T., Sushkova S., Mandzhieva S.* // Biology. 2021. V. 10. P. 267. https://doi.org/10.3390/biology10040267
14. *Kruger N. J.* In: The Protein Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks / Ed. J. M. Walker, Totowa, USA: Humana Press, 2009. P. 17–24.
15. *Yarullina L.G., Burkhanova G. F., Cherepanova E. A., Sorokan A. V., Zaikina E. A., Tsvetkov V. O.* et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. № 6. P. 760–769. https://doi.org/10.31857/S0555109921060131
16. *Fedina E.O., Karimova F. G., Tarchevsky I. A., Toropygin I. Y., Khripach V. A.* // Russ. J. Plant Phys. 2008. V. 55. P. 193–200. https://doi.org/10.1007/s11183–008–2005–0
17. *Conrath U., Beckers G. J. M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F. et al.* // Mol. Plant Microbe Interact. 2006. V. 19. P. 1062–1071.
18. *Максимов И.В., Сингх Б. П., Черепанова Е. А., Бурханова Г. Ф., Хайруллин Р. М.* // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 1. С. 19–34. https://doi.org/10.31857/S0555109920010134
19. *Gonzalez-Gallegos E., Laredo-Alcala E., Ascacio-Valdes J., de Rodriguez D., Hernandez-Castillo F.* // American Journal of Plant Sciences. 2015. V. 6. № 11. P. 1785–1791. https://doi.org/10.4236/ajps.2015.611179
20. *Yu Y., Gui Y., Li Z., Jiang C., Guo J., Niu D.* // Plants (Basel). 2022. V. 11. № 3. P. 386. https://doi.org/10.3390/plants11030386
21. Тарчевский *И. А., Егорова А. М.* // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 4. С. 315–329.
22. *Riseh R. S., Hassanisaadi M., Vatankhah M., Babaki S. A., Barka E. A.* // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 220. P. 998–1009.
23. *Suarez-Fernandeza M., Marhuenda-Egeac F. C., Lopez-Moyab F., Arnaod M. B., Cabrera-Escribanoe F., Nuedaf M. J. et al.* // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 572087. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572087
24. *Chakraborty M., Hasamezzaman M., Rahman M., Khan M. A.R., Bhowmik P., Mahmud N. U. et al.* // Agriculture. 2020. V. 10. № 12. P. 624. https://doi.org/10.3390/agriculture10120624
25. *Fabro G., Kovács I., Pavet V., Szabodos L., Alvarez M. E.* // Mol. Plant Microb. Intrract. 2004. V. 17. № 4. P. 343–350.
26. *Bordiec S., Paquis S., Lacroix H., Dhondt S., Barka E., Kauffmann A. et al.* // J. Exp. Botany. 2011. V. 62. P. 595–603. https://doi.org/10.1093/jxb/erq291
27. *Pfannschmidt T., Brautigam K., Wagner R., Dietzel L., Schroter Y., Steiner S., Nykytenko A.* // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 599–607. https://doi.org/10.1093/aob/mcn081
28. *Gagné-Bourque F., Mayer B. F.* // PLoS ONE. 2015. V. 10. № 6. P. e0130456. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130456
29. *Veselova S. V., Nuzhnaya T. V., Maksimov I. V.* In: Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development, Series Plant Science Research and Practices / Ed. L. Morrison. USA: Nova Sci. Publishers, 2015. P. 33–66.
30. *Glazebrook J.* // Annu. Rev. Phytopathol. 2005. V. 43. P. 205. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923

31. *Gimenez-Ibanez S., Solano R.* // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 72. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00072
32. *Chen F., Wang M., Zhang Y., Luo J., Yang X., Wang X.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 675–684.
33. *Vasyukova N. I., Ozeretskovskaya O. L.* // Russian Journal of Plant Physiology. 2009. V. 56. № 5. P. 581–590. https://doi.org/10.1134/S102144370905001X
34. *He M., Xu Y., Cao J.* // Protoplasma. 2013. V. 250. № 1. P. 1229–1240.
35. *Choi D. S., Hwang I. S., Hwang B. K.* // Plant Cell. 2012. V. 24. № 4. P. 1675–1690.
36. *Martinez-Medina A., Flors V., Heil M., Mauch-Mani B., Corné M. J., Pieterse C. M. J.* // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. P. 818–822. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.009
37. *Krompholz N., Krischkowski C., Reichmann D., Garbe-Schönberg D., Mendel R., Bittner F. et al.* // Chem. Res. Toxicol. 2012. V. 25. № 11. P. 2443. https://doi.org/10.1021/tx300298m
38. *Rixen S., Havemeyer A., Tyl-Bielicka A., Pysniak K., Gajewska M., Kulecka M. et al.* // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. RA119.007606. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007606
39. *Plitzko B., Havemeyer A., Kunze T., Clement B.* // Cell Biology. 2015. V. 290. № 16. P. 10126. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.640052
40. *Máthé C., Garda T., Freytag C., M-Hamvas M.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 3028. https://doi.org/10.3390/ijms20123028
41. *Moreno J. I., Martın R., Castresana C.* // The Plant Journal. 2005. V. 41. P. 451. https://doi.org/10.1111/j.1365–313X.2004.02311.x

Effect of Chitosan Conjugates with Oxycinnamic Acids and *Bacillus subtilis* Bacteria on the Activity of Protective Proteins and Resistance of Potato Plants to *Phytophthora infestans*

L. G. Yarullina[a, b, *], G. F. Burkhanova[a], V. O. Tsvetkov[b], E. A. Cherepanova[a], A. V. Sorokan[a], E. A. Zaikina[a], I. S. Mardanshin[c], I. Y. Fatkullin[a], I. V. Maksimov[a], J. N. Kalatskaja[d], N. A. Yalouskaya[d], and E. I. Rybinskaya[d]

[a] *Institute of Biochemistry and Genetics — a separate structural unit of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*
[b] *Ufa University of Science and Technology, Ufa, 450076 Russia*
[c] *Bashkir Research Institute of Agriculture — a separate structural unit of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*
[d] *Institute of Experimental Botany, V. F. Kuprevich National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus*
**e-mail: yarullina@bk.ru*

The effect of chitosan conjugates with caffeic (**ChCA**) and ferulic (**ChFA**) acids in combination with *Bacillus subtilis* bacteria on the transcriptional activity of PR protein genes and proteome changes in potato plants during infection with *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary was studied. Plants grown from mini tubers of the Luck variety were sprayed with solutions of ChCA and ChFA, suspension of *B. subtilis* bacteria strains 26D and 11 VM, composites of ChCA of ChFA together with bacteria. 3 days after treatment, some of the plants were infected with *P. infestans*. A decrease in the degree of development of the pathogen of late blight on potato leaves in all treatment options was revealed. The maximum protective effect was manifested when plants were treated with bacteria *B. subtilis* strain 26D in combination with conjugates of chitosan and oxycinnamic acids. The mechanisms of increasing the resistance of potato plants to *P. infestans* were associated with the activation of transcriptional activity of genes encoding the main protective protein (PR-1), chitinase (PR-3), thaumatin-like protein (PR-5), protease inhibitor (PR-6), peroxidase (PR-9), ribonuclease (PR-10). The revealed activation of the expression of marker genes of systemic acquired resistance and induced systemic resistance under the influence of joint treatment of plants with *B. subtilis* and chitin conjugates with oxycinnamic acids indicate the synergistic development of protective reactions in potato plants in this variant. By the method of two-dimensional electrophoresis of *S. tuberosum* leaf proteins followed by MALDI-TOF analysis, 12 proteins were identified, the presence of which in the leaves differed depending on the variant of the experiment. In all treatment variants, suppression of serine-threonine protein phosphatase activity was observed, reflecting the development of the hypersensitivity reaction. Different variants of the experiment formed weakly expressed clusters, which indicates multiple mechanisms of regulation of the synthesis of protective proteins involved in the reaction to treatment with bacteria, chitosan conjugates and infection with *P. infestans*.

Keywords: Solanum tuberosum, *Bacillus subtilis*, *Phytophthora infestans*, chitosan conjugates, caffeic and ferulic acids, gene expression, PR-proteins, proteome, induced resistance

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 193–204

УДК 632.9: 571.27

ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ *Bacillus subtilis* В СОЧЕТАНИИ С САЛИЦИЛАТОМ ХИТОЗАНА НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ТЕМНО-БУРОЙ ПЯТНИСТОСТИ *B. sorokiniana*

© 2024 г.
И. И. Новикова[1], Э. В. Попова[1], Н. М. Коваленко[1], И. Л. Краснобаева[1, *]

[1]*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР), Пушкин, Санкт-Петербург, 196608 Россия*

**e-mail: krasnobaeva08@mail.ru*

Поступила в редакцию 08.08.2023 г.
После доработки 02.11.2023 г.
Принята к публикации 05.11.2023 г.

Изучено влияние штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D, составляющих основу биопрепарата Витаплан, и их сочетаний с салицилатом хитозана на ферменты антиоксидантной защиты в процессе формирования устойчивости растений пшеницы, инфицированной возбудителем темно-бурой пятнистости *Bipolaris sorokiniana*. В растениях пшеницы, обработанных штаммами *B. subtilis* и их сочетаниями с салицилатом хитозана, при последующем заражении происходила активация каталазы и пероксидазы, регулирующих интенсивность окислительного стресса, индуцированного внедрением патогена. При этом также происходило включение защитных реакций, ведущих к развитию индуцированной устойчивости в растениях пшеницы к темно-бурой пятнистости, что проявлялось в снижении развития болезни на 25–45% по отношению к зараженному контролю в обработанных растениях. Полученные результаты свидетельствовали о перспективности сочетания активных штаммов микроорганизмов-антагонистов возбудителей болезней растений и салицилата хитозана для повышения биологической эффективности и расширения спектра действия разрабатываемых рецептурных форм биопрепаратов.

Ключевые слова: штаммы *Bacillus subtilis*, салицилат хитозана, каталаза, пероксидаза, *Bipolaris sorokiniana*, индуцированная устойчивость, пшеница

DOI: 10.31857/S0555109924020093 **EDN:** FZVMOE

Производство зерновых культур — главная отрасль сельского хозяйства России, играющая важнейшую роль в обеспечении продовольственной безопасности страны. При этом повышение урожайности зерновых культур — основная проблема современного земледелия, которая во многом определяется фитосанитарным состоянием посевов [1]. Современная технология возделывания зерновых культур предусматривает проведение комплекса мероприятий по защите от болезней разной этиологии, в частности химическое протравливание семян и обработка посевов фунгицидами в течение вегетации. Однако применение химических пестицидов не всегда экологически безопасно и может приводить к формированию устойчивых популяций фитопатогенных видов — возбудителей болезней растений. На современном этапе необходимо шире использовать альтернативные экологически малоопасные средства защиты растений. Один из факторов, существенно улучшающих фитосанитарное состояние посевов зерновых культур — использование полифункциональных биопрепаратов на основе живых культур микроорганизмов и комплексов их биологически активных веществ ростостимулирующего и защитного действия [2].

В настоящее время как в России, так и за рубежом наиболее широко применяют биопрепараты на основе штаммов *Bacillus subtilis* Cohn. [2–4]. Природные особенности штаммов *B. subtilis*, таких как: широкое биоразнообразие в пределах вида, способность к устойчивому росту на различных субстратах, симбиотические свойства, высокая антагонистическая активность, продукция целого ряда гидролитических ферментов и антибиотиков разных химических классов, устойчивость к неблагоприятным факторам среды и экологическая пластичность, обусловило их перспективность для получения новых биопрепаратов для защиты растений от болезней.

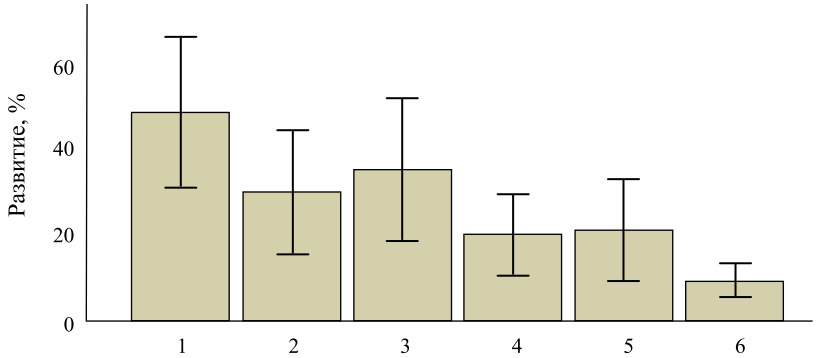

Рис. 1. Интенсивность развития (%) желтой ржавчины по сравнению с контролем (1) при применении КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D (2), Витаплана СП (3), 0.1 СХ (4), КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D + 0.1 СХ (5) и композиции КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D + 0.1 СХ (6) (2020 г.).

Биологическая активность таких биопрепаратов обусловлена способностью синтезировать биологически активные вещества, различающиеся по химической природе и механизму действия [2, 5, 6]. Активные вещества бацилл могут проявлять антивирусные, антибактериальные, антифунгальные свойства и элиситорную активность. Они обеспечивают как прямой антагонизм по отношению фитопатогенов, так и индукцию системной устойчивости растений [2, 7–12].

Во Всероссийском институте защиты растений (ВИЗР, Россия) разработан целый ряд полифункциональных биопрепаратов: Алирин-Б, Гамаир, Витаплан на основе штаммов бацилл этой группы, которые обладают по сравнению с химическими средствами защиты целым рядом преимуществ: отсутствием формирования резистентности у фитопатогенных видов, безопасностью для полезной энтомофауны, низкой токсичностью в отношении теплокровных и человека, а также способностью длительно контролировать численность фитопатогенов после интродукции в агробиоценоз.

Эффективность разработанных ВИЗР биопрепаратов в отношении распространенности и развития основных вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур достигает 60–90%, что обеспечивает повышение продуктивности на 20–25% и улучшение качества растениеводческой продукции [13]. С перспективами и проблемами применения биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* в сельском хозяйстве для борьбы с болезнями растений можно ознакомиться в недавно опубликованных обзорах [2, 14, 11].

В настоящее время усилия многих исследователей направлены на разработку методов повышения биологической эффективности биопрепаратов и обеспечения стабильного защитного эффекта. Для достижения этой цели применяется подход, позволяющий увеличивать способность штаммов-продуцентов запускать каскад защитных реакций и повышать системную устойчивость растений путем включения в состав препаратов природных или синтетических активаторов болезнеустойчивости. Для реализации этого направления в ВИЗР разработан ряд препаративных форм на основе сочетания штаммов микроорганизмов — антагонистов возбудителей болезней и активаторов болезнеустойчивости растений — хитозана и его производных. Высокий защитный эффект таких комплексных биопрепаратов обусловлен сочетанием антагонистических свойств штаммов микроорганизмов и способности хитозана совместно с биологически активными веществами активизировать механизмы естественной устойчивости растений к патогенам [13, 15–17], поскольку хитозан и хитоолигосахариды — эффективные элиситоры индуцированной устойчивости в растениях [18, 19].

В России широко известен разработанный в ВИЗР биопрепарат Витаплан, СП на основе отселектированных высокоактивных штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D для защиты сельскохозяйственных культур от грибных и бактериальных болезней [2]. В лаборатории микробиологической защиты разработаны образцы препаратов на основе сочетания этих штаммов и салицилата хитозана. В полевых условиях в течение ряда лет была показана их высокая эффективность в защите яровой мягкой пшеницы от корневой гнили и листовых инфекций [17, 20]. Например, наибольшее снижение интенсивности развития желтой ржавчины пшеницы по сравнению с контролем (на 26.4–40.1%) было зарегистрировано в вариантах опыта, в которых сочетали штаммы бацилл и 0.1%-ный салицилат хитозана [17, 20] (рис. 1).

Бациллы способны индуцировать системную устойчивость благодаря наличию у них бактериальных детерминантов (microbe-associated molecular patterns, **MAMPs**), таких как флагеллин, липополисахариды (**ЛПС**) и другие соединения, ассоциированные с клеточной стенкой *B. subtilis* [21–23],

а также летучие органические соединения [24, 25]. Растение распознает их благодаря своей эффективной иммунной системе, включающей белковые рецепторы (receptor recognition patterns, PRR). PRR-опосредованное микробное взаимодействие запускает различные защитные реакции, в том числе образование активных форм кислорода, фосфорилирование белков, запуск базовых механизмов фитоиммунитета, которые приводят к развитию системной устойчивости [26–28], включая активацию антиоксидантной защитной системы [29, 30].

В последние годы получила распространение гипотеза о том, что эффективное функционирование антиоксидантной защитной системы — основа адаптации растений к биотическим стрессам [31]. Повышение активности ключевых ферментов этой системы — каталазы и пероксидазы обеспечивает болезнеустойчивость растений к широкому кругу фитопатогенов. Эти ферменты играют определяющую роль в обезвреживании активных форм кислорода, являющихся неотъемлемой частью биотического стресса [32].

В ряде работ установлено, что бактерии-антагонисты способны повышать активность антиоксидантных ферментов, снижающих токсическое действие АФК, и индуцировать устойчивость к болезням у инфицированных растений [33, 34]. Так, сообщалось об увеличении синтеза ферментов антиоксидантной защиты: пероксидазы (**ПО**), полифенолоксидазы (**ПФО**), фенилаланин-аммиак-лиазы (**ФАЛ**) и супероксиддисмутазы (**СОД**), что приводило к развитию индуцированной системной устойчивости (**ISR**) против ранней фитофторозной гнили у рассады томата [35]. Показано, что штамм *Bacillus* sp. повышал активность СОД, ПО, ПФО и ФАЛ в инфицированном рисе, тем самым снижая индуцированное *Pyricularia oryzae* окислительное повреждение и подавляя заболеваемость пирикуляриозом [36]. Антагонист *Bacillus* sp. подавлял антракноз чили за счет активации защитных ферментов и накопления фенольных соединений [37]. Аналогично штамм *Bacillus* sp. повышал устойчивость сои к *Rhizoctonia solani и Fusarium oxysporum,* индуцируя синтез ферментов, связанных с антиоксидантной защитой (ФАЛ, ПО, ПФО) [38]. Показано, что штамм *B. subtilis* был способен снижать заболеваемость фузариозом, повышая активность антиоксидантных ферментов (ПО, ПФО, ФАЛ) в растениях огурца [39]. Индукция устойчивости штаммом *Bacillus* sp. к *Plasmopara halstedii* сопровождалась накоплением в подсолнечнике защитных ферментов (ФАЛ, ПО, ПФО) [40].

Таким образом, многочисленными исследованиями показана важность изучения особенностей функционирования антиоксидантных систем для понимания механизмов формирования защитного ответа растений к биотическим стрессам. В этой связи очевидна актуальность изучения роли антиоксидантных ферментов в индукции системной устойчивости растений пшеницы в ответ на обработку штаммами *Bacillus* spp. и их сочетаниями с салицилатом хитозана при заражении возбудителем темно-бурой пятнистости. Эти исследования представляют как теоретический, так и практический интерес.

Среди опасных возбудителей, поражающих пшеницу, можно назвать *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. em Sorok) (Shoemaker, 1959) — телеоморфа *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechsl ex Dastur — распространенный во всем мире фитопатогенный гриб, вызывающий заболевание пшеницы и других зерновых. Заболевание, вызываемое этим микромицетом, имеет несколько названий, например бурая пятнистость, обыкновенная корневая гниль и черная пятнистость зерна [41].

Цель работы — изучение действия штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D и их сочетаний с салицилатом хитозана (**СХ**) на ферменты антиоксидантной защиты при формировании устойчивости растений пшеницы к темно-бурой пятнистости.

МЕТОДИКА

В работе использовали яровую пшеницу *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29, которую заражали возбудителем темно-бурой пятнистости *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker. Штамм фитопатогенного микромицета был получен из Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей Центра коллективного пользования научным оборудованием “Инновационные технологии защиты растений” ФГБНУ ВИЗР.

Глубинное культивирование штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D проводили при 28°C в течение 72 ч на питательной среде следующего состава (г/л): кукурузный экстракт — 30, меласса — 15, pH 7.2 в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на круговой качалке при 220 об./мин. Титр жизнеспособных клеток в полученной культуральной жидкости (**КЖ**) составлял 10^{10} КОЕ/мл.

Схема опыта предусматривала следующие варианты.

1. Контроль (вода).

2. КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D в соотношении 1 : 1.

3. КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D + 0.1% СХ. При получении образца в питательную среду для глубинного культивирования добавляли 0.1% СХ.

4. Композиция КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D + 0.1% СХ. К 72-часовой КЖ (титр 10^9 КОЕ/мл) добавляли СХ до концентрации 0.1%.

5. СХ — 0.1%.

СХ получали из хитозана с молекулярной массой 60 кДа со степенью деацетилирования 85% (ООО “Биопрогресс”, Россия) согласно методу [42].

Титр жизнеспособных клеток в образцах определяли стандартным методом десятикратных серийных разведений с высевом на сухой питательный агар для культивирования микроорганизмов (СПА, НПО “Микроген”) и последующим подсчетом числа выросших колоний (ОФС.1.7.2.0008.15).

Образцы на основе сочетания штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D и СХ были включены в работу на основании их высокой биологической эффективности в отношении комплекса болезней разной этиологии в полевых опытах на яровой мягкой пшенице, проведенных ранее (данные не опубликованы). Например, наибольшее снижение интенсивности развития желтой ржавчины (на 40.1%) было зарегистрировано в варианте опыта с сочетанием КЖ + 0.1% СХ (композиция). В вариантах опыта 0.1% салицилат хитозана и КЖ + 0.1% СХ (глубинное культивирование) развитие болезни снижалось на 26.4% ($t = 2.6$) и 22.5% ($t = 2.1$) (рис. 1).

Опыты по оценке иммуномодулирующей активности исследуемых образцов проводили методом отделенных листьев. Семисуточные проростки мягкой пшеницы восприимчивого сорта Саратовская 29 опрыскивали растворами лабораторных образцов (из расчета 30 мл на 100 растений), согласно схеме опыта, за 24 ч до инокуляции патогеном — листовой формой гемибиотрофа *B. sorokiniana* (титр 4×10^3 спор/мл). Концентрация клеток (титр) штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D в образцах составляла 10^9 КОЕ/мл. На следующий день готовили газоны, нарезая и укладывая листья плотным слоем в кювете (30 × 30 см) на стеклянной пластине, покрытой фильтровальной бумагой. Затем кювету опрыскивали взвесью спор по 10 мл и оставляли в темноте на сутки. Время заражения считали началом опыта. На следующий день аккуратно добавляли раствор бензимидазола (0.004%), который поддерживает метаболизм в отрезках листьев пшеницы на уровне, при котором тип реакции к возбудителю соответствует таковому для интактных растений. Пораженность листьев оценивали на 4 сут после заражения *B. sorokiniana* в % площади листа. В контроле растения обрабатывали водой.

Влияние штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D и их сочетаний с СХ на активность ферментов оценивали при анализе проб листьев пшеницы, отобранных до заражения и на 1, 2, 3 и 4-е сутки после заражения *B. sorokiniana*. Варианты включали растения без заражения и обработок (контроль), растения, обработанные за 24 ч до заражения *B. sorokiniana*, и растения, обработанные штаммами *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D и их сочетаниями с СХ и 0.1% СХ без заражения.

Для определения активности ферментов навеску из 20 листьев растирали в 0.05 М фосфатном буфере (pH 6.2) в соотношении 1 : 5, экстрагировали 30 мин при 4°С, затем центрифугировали 10 мин при 8000 g на микроцентрифуге Eppendorf 5415R (“Eppendorf”, США).

Активность каталазы (**КАТ**) в листьях пшеницы определяли по методу Баха [43] на 1, 2, 3 и 4-е сутки после заражения *B. sorokiniana*, активность ПО — колориметрически по Бояркину [44].

Все опыты выполняли в 3 биологических и 3 химических повторностях.

Для обработки данных использовали дисперсионный анализ программы Statistica 6.0 (“StatSoft, Inc.”, США) и Excel 2016. При расчетах применили методы параметрической статистки на основе средних M и их стандартных ошибок ±SEM (95% доверительных интервалов, наименьшей существенной разности НСР при $p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки влияния штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D, СХ и их сочетаний на устойчивость растений пшеницы к инфицированию *B. sorokiniana* представлены в табл. 1.

Анализ развития темно-бурой пятнистости на листьях пшеницы показал, что в контрольных зараженных растениях признаки болезни наблюдались в виде бурых пятен, занимающих 60% площади листа (табл. 1). Предварительное опрыскивание растений КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D с последующим заражением возбудителем темно-бурой пятнистости снижало площадь поражения листьев до 40%.

Включение в среду для культивирования штаммов-продуцентов СХ в концентрации 0.1% сокращало пораженность листьев в 3 раза, что свидетельствовало о более высокой иммуномодулирующей активности этого образца. Добавление СХ к КЖ штаммов в концентрации 0.1% также положительно повлияло на индуцирующую способность антагониста, повышая его биологическую активность в 4 раза (площадь поражения листьев составила 15%) (табл. 1). Салицилат хитозана показал себя эффективным индуктором болезнеустойчивости, снизив пораженность растений более чем в 10 раз (5%).

Следует отметить, что при глубинной ферментации штаммов *B. subtilis* в среде с СХ происходило его расщепление хитиназами бактерий и утилизация в качестве питательного субстрата с образованием олигомеров хитозана [32], а также выход в ферментативную среду салициловой кислоты (**СК**), связанной с хитозаном ионной связью, вследствие диссоциации соли. Наличие в КЖ хитоолигосахаридов, которые, как известно, являются эффективными элиситорами индуцированной

устойчивости в растениях [19, 45] и СК как сигнальной молекулы, включающей каскад защитных реакций в растениях, можно объяснить усиление индуцирующей активности штаммов в этом варианте опыта. Поскольку сам СХ обладает хорошей иммуномодулирующей активностью, то включение СХ в культуральную жидкость штаммов приводило к повышению индуцирующей активности композиции *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D+0.1% СХ.

Механизм индуцирующего действия хитоолигосахаридов включает активацию генов защитных белков [46], усиление генерации активных форм кислорода, прежде всего H_2O_2, которая, в свою очередь, может также выполнять сигнальную функцию, активируя гены белков через редокс-контроль транскрипционных факторов или с помощью взаимодействия с другими сигнальными компонентами [27].

Одной из самых ранних защитных реакций, активируемых в тканях растений в ответ на атаку патогенов, является окислительный взрыв, характеризующийся быстрым и кратковременным высвобождением активных форм кислорода (**АФК**), представленных супероксидным анион-радикалом, гидроксильным радикалом, пероксидом водорода (H_2O_2), которые включают цепь последующих защитных реакций [47, 48]. H_2O_2 — наиболее химически стабильная АФК [49]. Показано, что пероксид водорода оказывает прямое противомикробное действие и участвует в перекрестном связывании клеточных стенок, а также в передаче сигналов, индукции экспрессии генов, гибели гиперчувствительных клеток и индуцированной системной приобретенной устойчивости [50]. Хотя АФК играют важную роль в устойчивости растений, их повышенный синтез приводит к значительному повреждению растительных клеток [51–53].

Процесс регуляции количества АФК в клетках инфицированных патогеном растений принадлежит антиоксидантным ферментам, среди них особое значение имеют ПО и КАТ [54–56].

С целью оценки участия антиоксидантных ферментов в формировании индуцированной устойчивости пшеницы к темно-бурой пятнистости предварительно было изучено действие штаммов бацилл и их сочетаний с СХ на активность антиоксидантных ферментов (КАТ и ПО) в незараженных проростках пшеницы.

Согласно полученным результатам, бактериальные штаммы оказывали значительное влияние на активность ферментов (табл. 2, 3)

Как видно из табл. 2, активность КАТ возрастала через 1 сут после обработки растений пшеницы штаммами *B. subtilis* и их комбинациями с СХ по отношению к контрольным необработанным растениям. Повышенная ативность КАТ в этих вариантах сохранялась в течение всего опыта. Наиболее высокий уровень активности КАТ отмечен у растений, обработанных комбинациями штаммов *B. subtilis* с СХ. В отличие от штаммов бактерий, СХ снижал активность КАТ на 1 сутки, однако в дальнейшем наблюдалось постепенное повышение активности этого фермента.

Изменение активности ПО в растениях пшеницы в различных вариантах опыта представлены в табл. 3. Выявлено значительное увеличение активности ПО, начиная с 3 сут после инокуляции штаммами *B. subtilis* и их сочетаниями с СХ. В обработанных растениях пшеницы наблюдался рост активности ПО в течение всего опыта с максимумом на 5 сут после обработки по отношению к необработанному контролю.

Наиболее высокий уровень активности фермента был отмечен у растений, обработанных *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ, который превышал активность ПО в контрольных растениях в 2.5 раза. Следует отметить, что, в отличие от остальных вариантов опыта, снижение активности ПО под действием СХ в 1 сут после обработки

Таблица 1. Влияние предварительной обработки листьев штаммами *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D и их сочетаний с салицилатом хитозана (СХ) на пораженность листьев пшеницы *B.sorokiniana*

Вариант опыта	Титр клеток *B. subtilis* в образце, КОЕ/мл	Пораженность листьев пшеницы, % ($НСР_{05}$ = 4.5)
Контроль (вода)	–	60
КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D	10^9	40
КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D + 0.1% СХ[a]	10^9	20
Композиция: КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D + 0.1% СХ[b]	10^9	15
СХ 0.1%	–	5

Примечание.[a] СХ добавляли в питательную среду для культивирования микроорганизмов; [b] СХ вводили в состав после окончания культивирования штаммов, при этом к 72-часовой КЖ (титр 10^9 КОЕ/мл) добавляли СХ до концентрации 0.1%.

Таблица 2. Влияние инокуляции штаммами *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D и сочетаниями с СХ на активность КАТ в листьях пшеницы

Вариант опыта	Активность КАТ, мкМоль H_2O_2/мин/г сырой массы листьев					
	до обработки	после обработки				
		1 сут	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут
Контроль (вода)	170	170	175	170	170	185
B. subtilis ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D	170	210	200	185	180	190
B. subtilis ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ	170	230	225	220	230	215
Композиция: *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ	170	200	205	210	215	210
СХ 0.1%	170	160	190	180	190	200
НСР $_{0.05}$	8.5	9.7	9.9	9.7	9.8	10.0

Таблица 3. Влияние инокуляции штаммами *B. subtilis* ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D и сочетаниями с СХ на активность ПО в листьях пшеницы

Вариант опыта	Активность ПО, усл. ед./г сырой массы листьев					
	до обработки	сутки после обработки				
	0	1	2	3	4	5
Контроль (вода)	12	11	12	13	12	13
КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D	11	14	14	16	21	22
КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ	12	12	16	25	30	34
Композиция КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ	11	11	13	20	24	29
СХ 0.1%	10	9	12	15	18	20
НСР $_{0.05}$	1.3	1.4	1.2	1.4	1.5	1.5

сменялось положительным влиянием этого полимера на активность фермента.

Таким образом, экспериментально установлено стимулирующее влияние штаммов *B. subtilis* и их сочетаний с СХ на активность КАТ и ПО, что свидетельствовало об активации антиоксидантной системы у растений пшеницы в ответ на обработку антагонистами.

Эти результаты согласуются с работами ряда авторов, в которых сообщалось о способности бактерий-антагонистов усиливать активность антиоксидантных ферментов в растениях томата и сои [57, 58].

Результаты изучения влияния штаммов *B. subtilis* и их комбинациями с СХ на активность антиоксидантных ферментов (КАТ и ПО) в зараженных растениях пшеницы представлены на рис. 2.

Анализ динамики изменения активности указанных ферментов в зараженных проростках пшеницы показал, что процесс заражения растений пшеницы возбудителем темно-бурой пятнистости сопровождался увеличением их активности относительно контрольных незараженных растений на всем протяжении опыта. Ко времени наибольшего развития болезни (4 сут после заражения), когда вся ткань листа была некротизирована, активность ферментов постепенно снижалась (рис. 2).

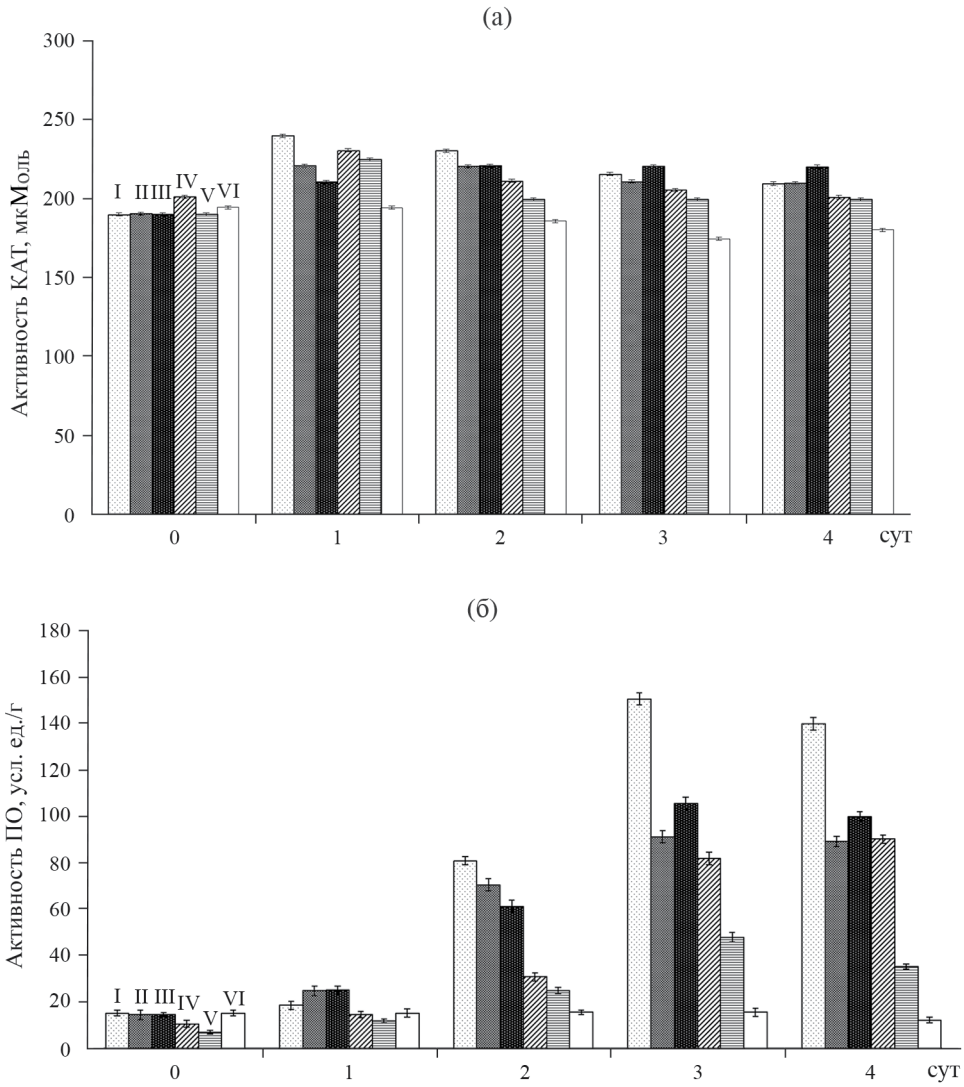

Рис. 2. Влияние заражения *B. sorokiniana* листьев пшеницы, обработанных штаммами *B. subtilis* и их сочетаниями с СХ, на активность КАТ (мкмоль H_2O_2/мин/г сырой массы листьев) (а) и ПО (усл. ед./г сырой массы листьев) (б): I — контроль зараженный; II — КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D; III — КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ; IV — композиция: КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ; V — 0.1% СХ; VI — незараженный контроль.

Полученные результаты экспериментов выявили временные различия в повышении активности антиоксидантных ферментов в процессе развития болезни (рис. 2). На 1 сутки в зараженных патогеном листьях пшеницы наблюдался резкий подъем активности КАТ с постепенным понижением ее активности на 4 сутки. Максимальное увеличение активности ПО наблюдалось на 3 сутки после заражения, когда проявлялись четкие признаки заболевания в виде коричневых пятен. Как известно, начальный этап инфицирования растений сопровождается активацией системы генерации АФК с накоплением пероксида водорода. Пероксид водорода, будучи субстратом КАТ, в свою очередь, индуцирует рост активности этого фермента, что способствует ее увеличению в 1 сутки после заражения. Активность ПО постепенно возрастала в зараженных проростках, достигнув на 3 сутки после заражения 10-кратного превышения по сравнению с незараженным контролем.

Дальнейшее развитие болезни сопровождалось повышенным уровнем активности ПО, которая, наряду с КАТ, включалась в контроль количества образующегося пероксида водорода.

Исследования показали, что начальный период (1–3 сут после заражения растений пшеницы)

сопровождался повышением активности КАТ и ПО, что свидетельствовало о вовлечении антиоксидантных ферментов в инфекционный процесс. Постепенное снижение активности антиоксидантных ферментов по мере развития болезни (4 сут) и переход патогена из биотрофной в некротрофную фазу приводило к возрастанию окислительных процессов, которые по интенсивности превосходили уровень активности антиоксидантной системы растения. В результате у растений инициировалось интенсивное некрозообразование, что создавало благоприятную среду обитания для патогена. Развитие болезни в этот период визуально проявлялось в виде коричневых пятен на листьях. Следствием этого становился рост восприимчивости растений к темно-бурой пятнистости, что соответствовало данным литературы [59].

Листья, обработанные штаммами бацилл и их сочетаниями с СХ и инокулированные патогеном, продемонстрировали также повышенную активность ферментов, но уровень их активности был ниже, чем в зараженном контроле. Так, активность КАТ в обработанных штаммами бацилл и их сочетаниями с СХ в зараженных проростках возрастала на 7–18% в 1-е сутки после заражения по сравнению с незараженным контролем, но была ниже, чем в зараженных контрольных растениях (рис. 2) в зависимости от варианта опыта. Отмечено, что на 3 сутки опыта активность КАТ в растениях, обработанных штаммами бацилл и их сочетаниями с СХ и инокулированных патогеном, была выше по сравнению с зараженным контролем.

Обнаружено, что обработка только СХ снижала активность фермента на 24% в 1-е сутки у зараженных растений, причем активность КАТ в этом варианте опыта оставалась ниже зараженного контроля в течение всего опыта.

Активность ПО в обработанных и инфицированных растениях на всем протяжении опыта также росла по отношению к незараженному контролю, достигая максимума на 3-и сутки, хотя уровень активности фермента был ниже, чем у контрольных зараженных растений. Так, обработка штаммами бацилл и их сочетаниями с СХ в 5.0–6.6 раз повышала активность ПО на 3-и сутки опыта, но при этом динамика изменения активности фермента оставалась такой же, как в зараженных контрольных растениях.

В обработанных СХ и зараженных растениях активность фермента на 3-и сутки в 3 раза превысила незараженный контроль, но уровень активности фермента оставался ниже по сравнению с другими вариантами опыта.

Полученные результаты согласовывались с более ранними сообщениями [37–40], в которых была показана способность бактерий-антагонистов усиливать активность антиоксидантных ферментов в качестве защитного механизма. Так, снижение развития пирикуляриоза в растениях риса, обработанных штаммами *Bacillus* spp., коррелировало с резким увеличением активности антиоксидантных ферментов, связанных с механизмами защиты: СОД (в 1.7 раза), ПО (в 3.5 раза), ПФО (в 3 раза) и др. Активность ферментов достигала максимума на 4-е сутки после инокуляции *Pyricularia oryzae*, что свидетельствовало о запуске ISR [36]. В растениях пшеницы, обработанных продуцирующим сурфактин штаммом *B. subtilis* 24Д и инфицированных грибом *Parastagonospora nodorum*, уже через 24 ч уровень анионной пероксидазы был в 3 раза выше по сравнению с контрольными растениями [7]. По данным Омара с соавт. [60], предобработка растений пшеницы *B. subtilis* за 24 ч до инокуляции патогеном повышала активность антиоксидантных ферментов (КАТ, ПО и ПФО), участвующих в ответной защитной реакции путем индукции устойчивости пшеницы к бурой ржавчине.

Штамм *Bacillus* sp. повышал устойчивость сои к *Rhizoctonia solani* и *Fusarium oxysporum*, индуцируя синтез ферментов, связанных с антиоксидантной защитой (ФАЛ, ПО, ПФО) [38]. Как упоминалось выше, антиоксидантные ферменты регулируют в клетках растений количество активных форм кислорода (**АФК**) и, в частности, H_2O_2, являющегося источником окислительного стресса при заражении патогенами [54].

Существенное значение в регуляции содержания H_2O_2 в тканях растений имеет КАТ. Установлено, что при возрастании ее активности содержание H_2O_2 уменьшается, что не позволяет развиться устойчивости, вследствие чего возрастает восприимчивость растений к патогенам. Напротив, уменьшение каталазной активности в клетках растений на начальной стадии патогенеза — необходимое условие сохранения высокого количества H_2O_2, требующегося для обезвреживания фитопатогена в тканях и формирования устойчивости [8, 28, 61]. ПО вовлечена как в генерацию, так и в утилизацию H_2O_2. Основная функция ПО — защита растительного организма от окислительного стресса, а также непосредственное участие в синтезе антимикробных соединений и укреплении клеточной стенки растения путем формирования лигнина, что коррелирует с устойчивостью [30] растений к болезням.

Полученные нами данные показали, что процесс заражения растений пшеницы возбудителем темно-бурой пятнистости сопровождался увеличением активности КАТ и ПО относительно контрольных незараженных растений. Выявлено, что активность КАТ и ПО, регулирующих количество H_2O_2 в предварительно обработанных штаммами *Bacillus* spp. и в сочетании с СХ и зараженных растениях, хотя и возрастала, но была ниже, чем в контрольных зараженных растениях.

Ингибирующее действие штаммов бацилл и их сочетаний с СХ на активность КАТ обусловлено

наличием в культуральной жидкости легко отщепляющейся от хитозана СК. Как известно из литературы и показано в предыдущих работах, индуцирующий эффект экзогенной СК при повышении устойчивости растений к фитопатогенам обусловлен ее способностью ингибировать каталазу — фермент, детоксицирующий пероксид водорода, что приводит к ее накоплению [42, 56, 62–64].

Экспериментально уставновлено, что активность КАТ и ПО в обработанных СХ растениях пшеницы после инокуляции патогеном на 1-е сутки понижалась, а затем возрастала до уровня, который был ниже, чем в зараженном контроле и всех других вариантах опыта. Отсюда следует, что более низкая активность КАТ и ПО в листьях растений обработанных композицией штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D + 0.1% СХ обусловлена ингибирующем действием содержащегося в ней СХ на ферменты.

Таким образом, в растениях пшеницы, обработанных штаммами *B. subtilis* и их сочетаниями с СХ при последующем заражении, происходит активация каталазы и пероксидазы, регулирующих интенсивность окислительного стресса, индуцированного внедрением патогена. Учитывая полученные данные, можно допустить, что повышение устойчивости растений к патогену реализуется через контроль активности антиоксидантных ферментов (в частности, КАТ, ПО), которые поддерживают концентрацию H_2O_2 на уровне, необходимом для обезвреживания и уничтожения фитопатогена в тканях, включая активацию сшивания и лигнификации. Эти процессы укрепляют клеточную стенку и помогают сдерживать распространение патогена в растении. При этом также происходит включение защитных реакций, ведущих к развитию индуцированной устойчивости в растениях пшеницы к темно-бурой пятнистости, что проявляется в снижении развития болезни на 25–45% по отношению к зараженному контролю в обработанных растениях (табл. 1).

Это предположение подтвердили исследования Яруллиной с соавт. [65], которые показали, что обработка растений картофеля штаммом *B. subtilis* совместно с хитоолигосахаридами сопровождалась активацией КАТ, ПО, накоплением H_2O_2 и транскриптов генов, кодирующих PR-белки, что приводило к развитию защитных реакций в растениях картофеля к возбудителю фитофтороза по пути индуцированной устойчивости. Причем в регуляцию содержания H_2O_2 в растениях картофеля на ранних этапах инфекционного процесса в этом случае вовлечены и КАТ, и ПО.

Полученные результаты свидетельствовали о перспективности сочетания штаммов — антагонистов возбудителей болезней растений и СХ для повышения биологической эффективности разрабатываемых биопрепаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Данная работа финансировалась за счет государственного задания в соответствии с тематическим планом ВИЗР по проекту по FGEU-2023–0006 “Разработка эколого-генетических основ отбора штаммов микробов-антагонистов, энтомопатогенных грибов и нематод; разработка технологий получения и применения новых полифункциональных препаратов для контроля численности вредных организмов (вредители, возбудители болезней) и повышения супрессивности почвы” из средств бюджета института (ВИЗР). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Павлюшин В. А., Лысов А. К.* // Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса. 2019. Т. 16. № 3. С. 69–78. https://doi.org/10.21046/2070-7401-2019-16-3-69-78
2. *Павлюшин В. А., Новикова И. И., Бойкова И. В.* // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 3. С. 421–438. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.3.421rus
3. *Штерншис М. В., Беляев А. А., Цветкова В. П., Шпатова Т. В., Леляк А. А., Бахвалов С. А.* Биопрепараты на основе бактерий рода Bacillus для управления здоровьем растений. Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской академии наук, 2016. 284 с.
4. *Новикова И. И., Бойкова И. В., Павлюшин В. А., Зейрук В. Н., Васильева С. В., Азизбекян Р. Р., Кузнецова Н. И.* // Вестник защиты растений. 2013. № 4. С. 12–21.
5. *Сидорова Т. М., Асатурова А. М., Хомяк А. И.* // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 1. С. 29–37. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.29rus
6. *Максимов И. В., Сингх Б. П., Черепанова Е. А., Бурханова Г. Ф.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 1. С. 19–34. https://doi.org/10.31857/S0555109920010134
7. *Черепанова Е. А., Благова Д. К., Бурханова Г. Ф., Сарварова Е. С.* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 3. С. 339–346. https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-339-346
8. *Vlot A. C., Sales J. H., Lenk M., Bauer K., Brambilla A.* et al. // New Phytol. 2020. V. 229. № 3. P. 1234–1250. https://doi.org/10.1111/nph.1695.3
9. *Jiao X., Takishita Y., Zhou G., Smith D. L.* // Front. Plant. Sci. 2021. № 12. P. 1–8. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634796
10. *Zehra A., Raytekar N. A., Meena M., Swapnil P.* // Cur. Res. Microb. Sci. 2021. № 2. P. 1–14. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100054

11. *Wang X. Q., Zhao D. L., Shen L. L., Jing C. L.* Application and Mechanisms of *Bacillus subtilis* in Biological Control of Plant Disease / Ed. V. S. Meena. Springer Singapore, 2018. P. 225–250. https://doi.org/10.1007/978–981–10–8402–7–9
12. *Максимов И. В., Веселова С. В., Нужная Т. В., Сарварова Е. Р., Хайрулин Р. М.* // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 6. С. 763–775. https://doi.org/10.7868/s0015330315060111
13. *Новикова И. И.* // Вестник защиты растений. 2016. Т. 83. № 3. С. 120–122.
14. *Chowdhury S. P., Hartmann A., Gao X. W., Borriss R.* // Front Microbiol. 2015. № 6. P. 780. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780
15. *Павлюшин В. А., Тютерев С. Л., Новикова И. И., Попова Э. В. и др.* // Доклады РАСХН. 2004. № 6. С. 17–21.
16. *Павлюшин В. А., Тютерев С. Л., Попова Э. В., Новикова И. И., Быкова Г. А., Домнина Н. С.* // Биотехнология. 2010. № 4. С. 69–80.
17. *Колесников Л.Е., Новикова И. И., Сурин В. Г., Попова Э. В., Приятькин Н. С., Колесникова Ю. Р.* // Прикл. биохимия и микробиология 2018. Т. 54. № 5. С. 546–552. https://doi.org/10.1134/S0555109918050082
18. *Yin H., Li Y., Zhang H. Y., Wang W. X., Lu H., Grevsen K. et al.* // Int. J. Plant Sci. 2013. V. 174. № 4. P. 722–732. https://doi.org/org/10.1086/669721
19. *Deeptmala K., Hemantaranjan A., Bharti S., Nishant Bhanu A.* //Advances in Plants & Agriculture Research. 2014. V. 1. № 1. P. 23–30 https://doi.org/10.15406/apar.2014.01.00006
20. *Колесников Л. Е., Попова Э. В., Новикова И. И., Приятькин Н. С., Архипов М. В., Колесникова Ю. Р. и др.* // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 5. С. 1024–1040. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.1024rus
21. *Van Loon L. C.* // Eur. J. Plant Pathol. 2007. V. 119. № 3. P. 243–254. https://doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1
22. *De Vleesschauwer D., Höfte M.* // Advances in Botanical Research. 2009. № 51. P. 223–281. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51006-3
23. *Veselova S. V., Nuzhnaya T. V., Maksimov I. V.* In: Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development / Ed. L. Morrison, N.Y.: Nova Sciense, 2015. P. 33–66.
24. *Ryu C. M., Farag M. A., Hu C. H., Reddẻ M. S., Kloepper J. W., Parẻ P. W.* // Plant Physiology. 2004. V. 134. № 3. P. 1017–1026. https://doi.org/10.1104/pp.103.026583
25. *Farag M. A., Zhang H., Ryu C. M.* // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. P. 1007–1018. https://doi.org/10.1007/s10886-013-0317-9.
26. *Kavitha K., Nakkeeran S., Chandrasekar G.* // Arch. Phytopathol. Plant Protect. 2012. V. 45. P. 199–219.
27. *Torres M. A.* // Physiologia Plantarum. 2010. V. 138. № 4. P. 414–429. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x
28. *Yarullina L. G., Kasimova R. I., Ibragimov R. I., Akhatova A. R., Umarov I. A., Maksimov I. V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. № 1. P. 71–78. https://doi.org/10.1134/S0003683816010154
29. *Choi H. W., Klessig D. F.* // BMC Plant Biol. 2016. V. 16. № 1. P. 232. https://doi.org/10.1186/s12870–016–0921–2
30. *Максимов И. В., Абизгильдина Р. Р., Сорокань А. В., Бурханова Г. Ф.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 197–202.
31. *Радюкина Н. Л., Михеева Л. Е., Карбышева Е. А.* // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139. № 3. С. 254–266. https://doi.org/10.1134/S0042132419030062
32. *Тютерев С. Л.* Научные основы индуцированной устойчивости растений. СПб: Наука, 2002. 328 с.
33. *Radhakrishnan R., Shim K. B., Lee B. W., Hwang C. D., Pae S. B., Park C. H. et al.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 23. № 6. P. 856–863. https://doi.org/10.4014/jmb.1209.09045
34. *Kang S. M, Radhakrishnan R., Lee I. J.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 31. № 10. P. 1517–1527. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1896-0
35. *Chowdappa P., Kumar S. M., Lakshmi M. J., Mohan S. P., Upreti K. K.* // Biol. Control. 2013. № 65. P. 109–117.
36. *Rais A., Jabeen Z., Shair F., Hafeez F. Y., Hassan M. N.* // PLoS One. 2017. V. 12. № 11. P. e0187412. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187412
37. *Jayapala N., Mallikarjunaiah N., Puttaswamy H., Gavirangappa H., Ramachandrappa N. S.* // J. Biol. Pest Control. 2019. № 29. P. 45.
38. *Jain S., Vaishnav A., Kumari S., Varma T., Tuteja N., Kumar Choudhary D.* // J. Plant Growth Regul. 2017. № 36. P. 200–214.
39. *Fang Chen, Min Wang, Yu Zheng, Jianmei Luo, Xiurong Yang, Xuelian Wang.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. № 4. P. 675–684. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0222-0222-0
40. *Nandeeshkumar P., Ramachandrakini K., Prakash H. S., Niranjana S. R., Shekar Shetty H.* // J. Plant Interact. 2008. № 3. P. 255–262.
41. *Duveiller E., Chand R., Singh H. V., Joshi A. K.* // Plant Pathology Journal. 2002. V. 18. № 6. P. 328–332. https://doi.org/10.5423/PPJ.2002.18.6.328
42. *Попова Э. В., Домнина Н. С., Сокорнова С. В., Коваленко Н. М., Тютерев С. Л.* // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56. № 1. С. 158–170. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.1.158rus
43. *Новиков Н. Н., Таразанова Т. В.* Лабораторный практикум по биохимии растений: Учебное пособие. М.: Издательство РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, 2012. 97 с.
44. *Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П., Перуанский Ю. В., Луковникова Г. А., Иконникова М. И.* Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. 429 с.
45. *Yin H., Li Y., Zhang H. Y., Wang W. X., Lu H., Grevsen K., Zhao X., Du Y.* // Int. J. Plant Sci. 2013. V. 174. № 4. P. 722–732. https://doi.org/10.1086/669721
46. *Yafei C., Yong Z., Xiaoming Z., Peng G., Hailong A., Yuguang D., Yingrong H., Hui L., Yuhong Z.* // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 47. P. 724–731.

47. *Zurbriggen M.D., Carrillo N., Hajirezael M. R.* // Plant Signaling and Behavior. 2010. № 5. P. 393–396. https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10793
48. *Ahanger R. A., Bhat H. A., Ganie S. A., Lone A. A., Bhat T. A., Wani I. A. et al.* // Inter. J. Pharmacy Review & Research. 2014. V. 4. № 1. P. 68–74.
49. *Ali M., Cheng Z., Ahmad H., Hayat S.* // J. Plant Interactions. 2018 V. 13. № 1. P. 353–363. https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1484188
50. *Quan L-J., Zhang B., Shi W.-W., Li H.-Y.* // J. Integr. Plant Biol. 2008. V. 50. № 1. P. 2–18. https://doi.org/10.1111/j.1744–7909.2007.00599.x
51. *Gupta D., Pena L., Romero-Puertas M., Hernandez A., Inouhe M, Sandalio L.* // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. № 4. P. 509–526. https://doi.org/10.1111/pce.12711
52. *Schmitt F.-J., Renger G., Friedrich T., Kreslavski V. D., Zharmukhamedov S. K., Los D. A. et al.* // Biochim. Biophysю Acta. 2014. V. 1837. № 6. P. 835–848. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2014.02.005
53. *Vellosillo T., Vicente J., Kulasekaran S., Hamberg M., Castresana C.* // Plant Physiology. 2010. V.154. № 2. P. 444–448. https://doi.org/10.1104/pp.110.161273
54. *Jindrichova B., Fodor J., Šindelářová M., Burketova L., Valentova O.* // Environ. Exper. Bot. 2011. V. 72. № 2. P. 149–156. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.02.018
55. *Gill S. S., Tuteja N.* // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 48. № 12. P 909–930. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016
56. *Максимов И. В., Черепанова Е. А.* // Успехи современной биологии. 2006. № 126. С. 250–261.
57. *Rashad Y. M., Abdalla S. A., Sleem M. M.* // Plants. 2022. V.11. № 15. P. 2051. https://doi.org/10.3390/plants11152051
58. *Roohallah S.-R., Fariba F., Mojtaba M.-E.* // J. Crop. Prot. 2020. V. 9. № 1. P. 1–16.
59. *Озерецковская О. Л., Васюкова Н. И.* // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 4. С. 546–553.
60. *Omara R., Essa T., Khalil A., Elsharkawy M.* // Egyptian Journal of Biological Pest Control. 2020. V. 30. P. 83. https://doi.org/10.1186/s41938-020-00284-3
61. *Hung K. T., Hsu Y. T., Kao C. H.* // Physiol. Plant. 2006. V. 127. № 2. P. 293–303. https://doi.org/1399-3054.2006.00662.xhttps://doi.org/10.1111/j
62. *Dieryckx C., Gaudin V., Dupuy J.-W., Bonneu M., Girard V., Job D.* // Frontier in Plant Science. 2015. № 6. P. 859–867. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00859
63. *Zakariyya F., Wahyu Susilo A., Iman Santoso T., Susilo Addy H., Pancaningtyas S.* // Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal). 2018. V. 34. № 1. P. 33–39. https://doi.org/10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v34i1.305
64. *Васюкова Н. И., Озерецковская О. Л., Чаленко Г. И., Герасимова Н. Г., Львова А. А., Ильина А. В. и др.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 379–384.
65. *Яруллина Л. Г., Бурханова Г. Ф., Цветков В. О., Черепанова Е. А., Заикина Е. А., Сорокань А. В. и др.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 2. С. 185–194. https://doi.org/10.31857/S0555109922020179

Effect of *Bacillus subtilis* in Combination with Chitosan Salicylate on Peroxidase and Catalase Activity in *B. sorokiniana* Infected Wheat

I. I. Novikova[a], E. V. Popova[a], N. M. Kovalenko[a], and I. L. Krasnobaeva[a, *]
[a]*All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, 196608 Russia*
**e-mail: krasnobaeva08@mail.ru*

The aim of the work was to study the effect of *Bacillus subtilis* strains VKM B-2604D and VKM B-2605D which form the basis of the Vitaplan biological product, and their combinations with chitosan salicylate on antioxidant defense enzymes in the process of formation of resistance of wheat plants to infection with the dark brown blotch pathogen Bipolaris sorokiniana. In wheat plants treated with B. subtilis strains and their combinations with chitosan salicylate, upon subsequent infection, catalase and peroxidase are activated, which regulate the intensity of oxidative stress induced by the introduction of the pathogen. Taking into account the data obtained by us, it can be assumed that the increase in plant resistance to the pathogen is realized through the control of the activity of antioxidant enzymes (in particular, catalase, peroxidase), which maintain the concentration of H_2O_2 at the level necessary for the neutralization of the phytopathogen in tissues, including the direct destruction of the invading pathogen and / or activation of crosslinking and lignification of the cell wall. These processes strengthen the cell wall and help contain the spread of the pathogen in the plant. At the same time, protective reactions are also switched on, leading to the development of induced resistance in wheat plants to dark

brown spotting, which manifests itself in a decrease in the development of the disease by 25–45% relative to the infected control in the treated plants. The obtained results indicate that the combination of active strains of microorganisms-antagonists of plant pathogens and chitosan salicylate is promising for increasing the biological efficiency and expanding the spectrum of action of the developed prescription forms of biological products.

Keywords: *Bacillus subtilis* strains, chitosan salicylate, catalase, peroxidase, *Bipolaris sorokiniana*, induced resistance, wheat

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 2, с. 205–218

УДК 632.9:57.021

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ *Bacillus subtilis* И САЛИЦИЛАТА ХИТОЗАНА ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ ПШЕНИЦЫ

© 2024 г. **И. И. Новикова[2], Л. Е. Колесников[1, *], Э. В. Попова[2], Б. А. Хассан[3], Н. С. Прияткин[4], Д. Ю. Радишевский[1], И. Л. Краснобаева[2], Л. А. Хигерович[2], Ю. Р. Колесникова[5]**

[1]*Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, факультет агротехнологий, почвоведения и экологии, Санкт-Петербург, Пушкин, 196601 Россия*

[2]*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, лаборатория микробиологической защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, 196608 Россия*

[3]*Ministry of Agriculture, Agricultural Research Office, Abo-Ghraib, St. Al-Zaytun, H. 10081, Baghdad, Iraq*

[4]*Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, 195220 Россия*

[5]*ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190031 Россия*

**e-mail: kleon9@yandex.ru*

Поступила в редакцию 08.08.2023 г.
После доработки 02.11.2023 г.
Принята к публикации 05.11.2023 г.

Показано, что применение при возделывании пшеницы полифункциональных комплексов на основе бактериальных штаммов *Bacillus subtilis* и 0.1%-ного салицилата хитозана приводило к существенному снижению поражаемости растений болезнями: желтой и бурой ржавчиной, мучнистой росой, корневой гнилью и обусловливало рост морфометрических показателей продуктивности. Такая тенденции была связана со значительным влиянием полифункциональных комплексов на увеличение числа первичных и узловых корней; длину узловых корней; продуктивную кустистость; число колосков в колосе, массу зерен одного колоса. Однако эффективность защитных и стимулирующих обработок пшеницы зависела также от комплекса природно-климатических факторов сезонов вегетации пшеницы.

Ключевые слова: биопрепараты, салицилат хитозана, бактериальные штаммы, *Bacillus subtilis*, мягкая пшеница, элементы продуктивности, болезни пшеницы

DOI: 10.31857/S0555109924020109 **EDN:** FZRAGF

Альтернатива химическим средствам защиты растений — использование индукторов болезнеустойчивости растений, способных стимулировать врожденные механизмы защиты растений, в том числе изменять обмен веществ в неблагоприятную для возбудителя болезни сторону. При этом формирование защитного ответа обусловлено экспрессией генов под действием сигнальных молекул и экзогенных биологически активных веществ — иммуномодуляторов [1, 2]. Перспективный индуктор болезнеустойчивости растений – хитозан. Однако его биологическая эффективность определяется его составом и свойствами: молекулярной массой, наличием примесей, степенью замещения и др. Чем ниже молекулярная масса полимера, тем легче он проникает в ядра клеток растений, способствуя ускорению морфогенеза, накоплению фитоалексинов и хитиназ, вызывая ускорение роста и повышенную устойчивость к фитопатогенам [3–6].

Хитозан обладает высокой ростостимулирующей и элиситорной активностью, выраженными антибактериальными и фунгицидными свойствами. Он совместим с органическими и микробиологическими средствами защиты, усиливает и пролонгирует их действие, оставаясь безопасным для растений, почвы и человека [7]. Хитозан обладает свойствами биофунгицидов, биобактерицидов и биовирулицидов, тем самым обеспечивая комплексную защиту растений от вредных микроорганизмов. Хитозан — N-деацетилированное производное хитина, основного структурного полимера, входящего, в частности, в состав оболочки насекомых, экзоскелета ракообразных. По химической природе хитозан — это линейный полимер, природный полисахарид, состоящий из связанных между собой 1,4-гликозидными связями D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина [8].

Постоянно ведутся поиски хитинсодержащего сырья, специфичного для отдельных регионов, но основной его источник — отходы от переработки различных ракообразных — крабов, креветок и криля. Альтернативой хитозану, получаемому из панцирей ракообразных, являются хитозан-глюкановые комплексы (**ХтГК**), выделенные из высших базидиальных грибов [9]. Для практического применения в растениеводстве в России был разработан ряд биопрепаратов на основе хитозана с коммерческими наименованиями “Нарцисс”, “Экогель” и “Агрохит” [3].

Бактерии, широко используемые в биологической защите растений — *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Serratia* spp. и *Paenibacillus spp.*— могут индуцировать ферменты, связанные с проявлением устойчивости растений к болезням, включая хитиназу, фенилаланин-аммиак-лиазу, пероксидазу, липоксигеназу, супероксиддисмутазу [10]. Высокая биологическая эффективность биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* определяется их особенностью активно колонизировать ризосферу растений, синтезировать антибиотики широкого спектра антимикробной активности и долгое время сохраняться в растительном биоценозе в форме эндоспор. Их применение для защиты сельскохозяйственных культур может снизить поражаемость растений многими возбудителями болезней [11].

Бактерии рода *Bacillus*, и в частности *B. subtilis* Z-14, синтезируют липопептидные антибиотики, в том числе итурины, фенгицины и сурфактины [12]. Они оказывают прямое или косвенное ингибирующее действие на возбудителей микозов растений, но не токсичны для самих растений [13]. Липопептидные антибиотики относительно стабильны по своей природе и устойчивы к кислотам и щелочам, что гарантирует длительность их антагонистического действия. Итурины и фенгицины обладают широким спектром действия против фитопатогенных грибов [14]. Штаммы *B. subtilis* способны синтезировать сурфактин и повышать устойчивость пшеницы к болезням [15, 16]. Обработка растений бактериями может индуцировать биосинтез и метаболизм терпеноидов, активность хитиназы, фенилпропаноидов, активизировать механизмы активации защитных сигнальных путей [10].

Однако жизнедеятельность бактерий при различных метеорологических условиях может варьировать, большое влияние на них оказывают внешние факторы, такие как свет, температура и влажность. При определенном сочетании метеофакторов эффективность бактериальных препаратов в полевых условиях нестабильна и может существенно снижаться в отношении вредных организмов [17].

Одно из наиболее приоритетных направлений в практике экологизированного адаптивного земледелия в настоящее время — использование полифункциональных биопрепаратов, эффективных в отношении широкого спектра фитопатогенов и позволяющих получить качественную сельскохозяйственную продукцию. Подобные препараты могут положительно влиять как на отдельные стороны обмена веществ, так и на функциональное состояние растительного организма в целом [5, 18].

Прогресс в семеноведении тесно связан с техническими инновациями и их доступностью для применения. Кроме того, на основе технологических достижений разрабатываются новые методы оценки качества семян для их тестирования [19]. Инструментальные методы, потенциально пригодные для неинвазивной оценки качества семян, можно разделить на три группы [20]. Первая группа — группа оптических методов, которые включают цифровую оптическую визуализацию [21], мультиспектральную визуализацию [22], измерение флуоресценции хлорофилла [23]. К интроскопическим методам относятся микрофокусная рентгенография [24, 25], компьютерная микротомография [26] и магнитно-резонансная томография [27]. Третью группу составляют электрофизические методы (электрофотография) [28].

Цель настоящей работы — биологическое обоснование эффективности применения полифункциональных комплексов на основе штаммов *B. subtilis* и 0.1%-ного салицилата хитозана при возделывании мягкой пшеницы.

МЕТОДИКА

Место проведения работы — лаборатория микробиологической защиты растений ФГБНУ ВИЗР, кафедра защиты и карантина растений ФГБОУ ВО СПбГАУ. Экспериментальные исследования выполнены на полях научно-производственной базы “Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР” ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова” (ВИР).

Растительным материалом для проведения исследования послужил сорт мягкой пшеницы яровой Ленинградская 6, к-64900 из отдела генетических ресурсов пшеницы ВИР.

Образцы пшеницы были высеяны на делянках площадью 1.0 м^2 рядовым способом посева с междурядьями 15 см и расстоянием в ряду 1–2 см (300 зерен/м^2). Глубина заделки семян: 5–6 см. Полевой опыт по определению влияния биопрепаратов и хитозановых комплексов на фитосанитарное состояние посевов выполнен в трехкратной повторности.

Материалом для исследований служили штаммы *B. subtilis* И-5, *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D (Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и их вредителей ВИЗР), проявляющие высокую антагонистическую

активность в отношении тест-культур фитопатогенных грибов и бактерий. При глубинном культивировании бактерии выращивали на оптимизированной кукурузно-мелассной среде следующего состава (г/л): кукурузный экстракт — 30, меласса — 15; pH 7.8 (ООО "Каргилл", ООО "Агроресурс", Россия) при 27–28°C в течение 72 ч с аэрацией (150 об./мин, шейкер-инкубатор NewBrunswick™ Innova® 44, Германия) в колбах объемом 750 мл с 100 мл среды. Отбор проб и оценку развития культур осуществляли с помощью светового микроскопа Axio Imager A-2 ("Karl Zeiss", Германия) один раз в сутки. Титры жизнеспособных клеток определяли методом серийных разведений с высевом на агаризованные среды: агар Чапека ("HiMedia Laboratories", Индия); сухой питательный агар СПА (АО "НПО "Микроген", Россия).

В полевых опытах в качестве стандарта использовали биопрепарат Витаплан СП, разработанный в ВИЗР на основе высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis* (ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D), который широко используется в России для защиты сельскохозяйственных культур от грибных и бактериальных болезней.

Схема опыта предусматривала следующие варианты:

- без обработки (контроль);
- Витаплан, СП (стандарт, титр жизнеспособных клеток 10^{10} КОЕ/г);
- Культуральная жидкость (**КЖ**) штамма *B. subtilis* И-5 (титр жизнеспособных клеток 10^{10} КОЕ/мл);
- КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D и *B. subtilis* ВКМ B-2605D в соотношении 1 : 1 (КЖ *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D), титр жизнеспособных клеток 10^{10} КОЕ/мл;.
- полифункциональный комплекс *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ (титр жизнеспособных клеток 10^{10} КОЕ/мл), салицилат хитозана (**СХ**) в концентрации 0.1% добавляли в питательную среду для культивирования штаммов (титр жизнеспособных клеток 10^{10} КОЕ/мл);
- полифункциональный комплекс *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ (титр жизнеспособных клеток 10^{10} КОЕ/мл), салицилат хитозана в концентрации 0.1% добавляли в питательную среду для культивирования штамма.

В условиях полевого опыта использовали препараты в разведении 1 : 10. Проводили полусухое протравливание семян яровой мягкой пшеницы (сорт Ленинградка 6, к-64900) перед посевом при норме применения 2.5 мл/100 г семян и трехкратное опрыскивание вегетирующих растений рабочими растворами препаратов при норме применения 100 мл/м^2. Стандарт Витаплан, СП использовали при норме применения 2 мг/100 г семян для предпосевной обработки и 40 мг/10 м^2 для опрыскивания растений в соответствии с регламентом применения Витаплана, СП ("Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения на территории РФ", 2023 г.).

Метеорологические данные были предоставлены отделом агрометеорологии ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР). Данные по общему числу пятен на Солнце и среднемесячным числам Вольфа были предоставлены Королевской обсерваторией Бельгии (SILSO, World Data Center) и Дальневосточным управлением по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Россия).

Для микрофокусной съемки семян использовали аппаратно-программный комплекс на основе передвижной рентгенодиагностической установки ПРДУ-02, применяемой для контроля качества семян (совместная разработка ФГБНУ АФИ и Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета ЛЭТИ им. В.И. Ульянова-Ленина; предприятие-изготовитель ЗАО "ЭЛТЕХ–Мед", Санкт-Петербург, Россия). Коэффициент увеличения изображения при рентгеновской съемке составлял 3.0½. Программная обработка цифровых рентгеновских изображений семян пшеницы осуществлялась в программе "ВидеоТесТ-Морфология 5.2". Анализировали следующие параметры изображений: средний размер проекции семени (мм), среднюю яркость рентген-проекции семени (ед. яркости), округлость семени (относительные единицы, отн. ед.), удлиненность семени (относительные единицы).

Подробное описание методов фитопатологического и фитометрического анализов посевов пшеницы, а также алгоритмы статистической обработки данных эксперимента приведены в статьях [29, 30].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований (2019–2022 гг.) было проанализировано влияние природно-климатических факторов на динамику изменения фитометрических и фитопатологических характеристик посевов пшеницы при применении полифункционального комплекса *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ. Максимальное увеличение урожайности пшеницы (на 82.6% по сравнению с контролем) наблюдали в 2020 г., что было связано с существенным ростом продуктивной кустистости растений и массы колоса — на 58.7 и 26.9% соответственно. Кроме того, в 2020 г. при его применении зарегистрировано наибольшее снижение поражаемости растений мучнистой росой и желтой ржавчиной по сравнению с контролем — на 52.5 и 27.8% соответственно (рис. 1). При этом пораженность растений корневой гнилью была незначительна. Метеоусловия вегетационного периода 2020 г. отличались максимальным числом выпавших осадков

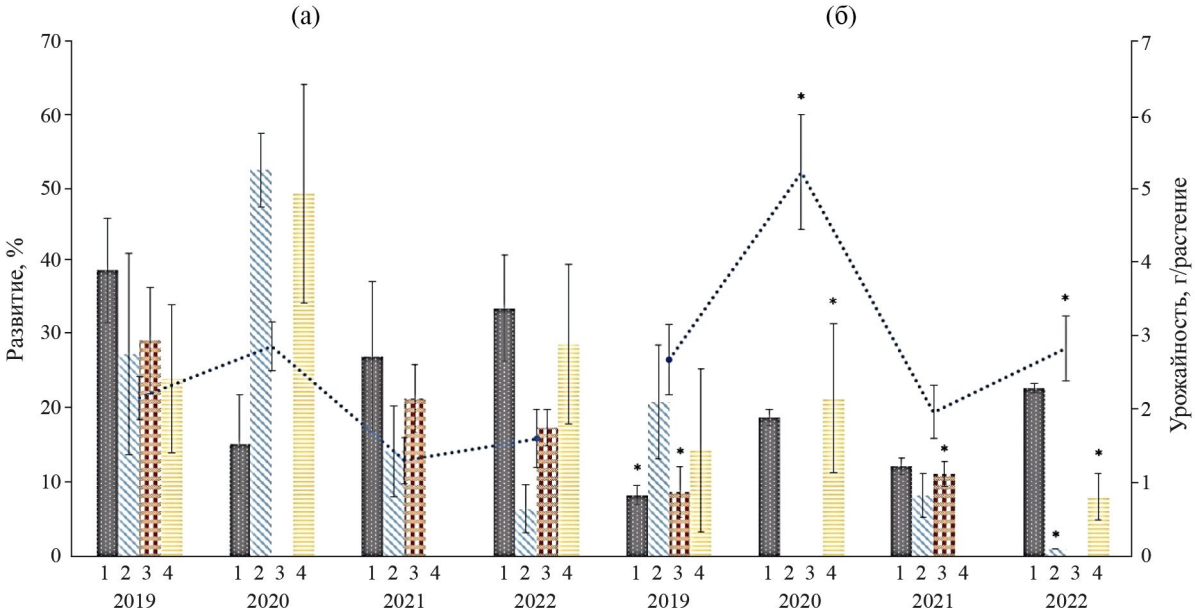

Рис. 1. Поражаемость пшеницы болезнями и ее урожайность в контрольном варианте (а) и при использовании полифункционального комплекса *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ (б) в 2019–2022 гг.: 1 — развитие корневой гнили; 2 — развитие мучнистой росы; 3 — развитие бурой ржавчины; 4 — развитие желтой ржавчины; 5 — урожайность пшеницы. *Различия достоверны согласно 95%-ному доверительному интервалу для средних измерений показателя.

в мае ($O_{май}$ = 61.3 мм), июне ($O_{июнь}$ = 66.8 мм), июле ($O_{июль}$ = 90.6 мм), а в августе значения метеопоказателя составило: $O_{авг/сут}$ = 97.2 мм. Сумма температур в мае — $T_{май}$ = 119.6°C, а в июне-августе — 528.4, 499.9 и 485.4°C соответственно. Тепловлагообеспеченность в вегетационный период в июле и августе была на уровне переувлажнения (гидротермический коэффициент: ГТК = 2.0).

Кроме того, существенный рост урожайности пшеницы на 76.4% при применении полифункционального комплекса *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ был выявлен также и в 2022 г. Вегетационный период 2022 г. отличался минимальным числом выпавших осадков в мае ($O_{май}$ = 4.3 мм) и максимальным — в августе ($O_{май}$ = 138.5 мм). При этом в августе сумма температур была максимальной $T_{авгсут}$ = 544.9°C. Значения ГТК в июле и августе существенно варьировали: $ГТК_{июль}$ = 1.2 (достаточное увлажнение); $ГТК_{август}$ = 2.5 (переувлажнение), годовое число пятен на Солнце было максимальным: N_s = 83.1.

Методом непараметрического корреляционного анализа изучена метеорологическая обусловленность изменений в фитопатологических и морфометрических показателях продуктивности пшеницы при применении полифункционального комплекса *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ, а также их причинно-следственные связи с активностью Солнца. Выявлены факторы, определяющие наибольшее экологическое варьирование указанных показателей по годам исследования, характеризующие эффективность применения полифункционального комплекса. Существенное влияние на повышение эффективности полифункционального комплекса в отношении пораженности пшеницы мучнистой росой, характеризуемой площадью пятна с налетом, оказала сумма осадков в июле, с ростом величины которой наблюдали снижение данного показателя патогенеза (r = –0.99).

Зарегистрировано снижение эффективности полифункционального комплекса *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ в отношении развития мучнистой росы (r = 0.99) и увеличение в отношение площади пустулы бурой ржавчины (r = –0.99) с увеличением суммы температур в августе. Величины относительных изменений числа пятен с налетом мучнистой росы и площади пустулы бурой ржавчины при применении полифункционального комплекса по сравнению с контролем обратно коррелировали с годовым числом пятен на Солнце (r = –0.99). Рост УФ-индекса в июне оказывал положительное влияние на развитие бурой ржавчины пшеницы, что обусловливало снижение эффективности полифункционального комплекса к болезни (r = 0.99).

Выявлены прямые корреляционные связи при P < 0.05 между изменением урожайности пшеницы Y_w при применении полифункционального комплекса *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ и суммой температур в августе (r = 0.96), годовым числом пятен на Солнце (r = 0.97),

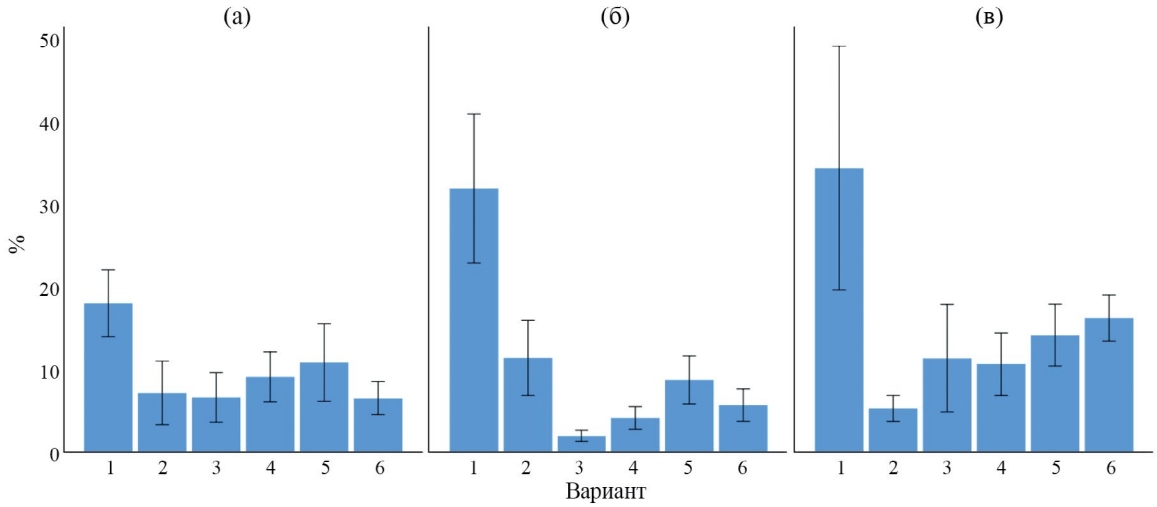

Рис. 2. Интенсивность развития желтой ржавчины (%) пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ (4, 5), 2022 г.: 1 — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — *B. subtilis* И-5. (а, б, в — повторности опыта).

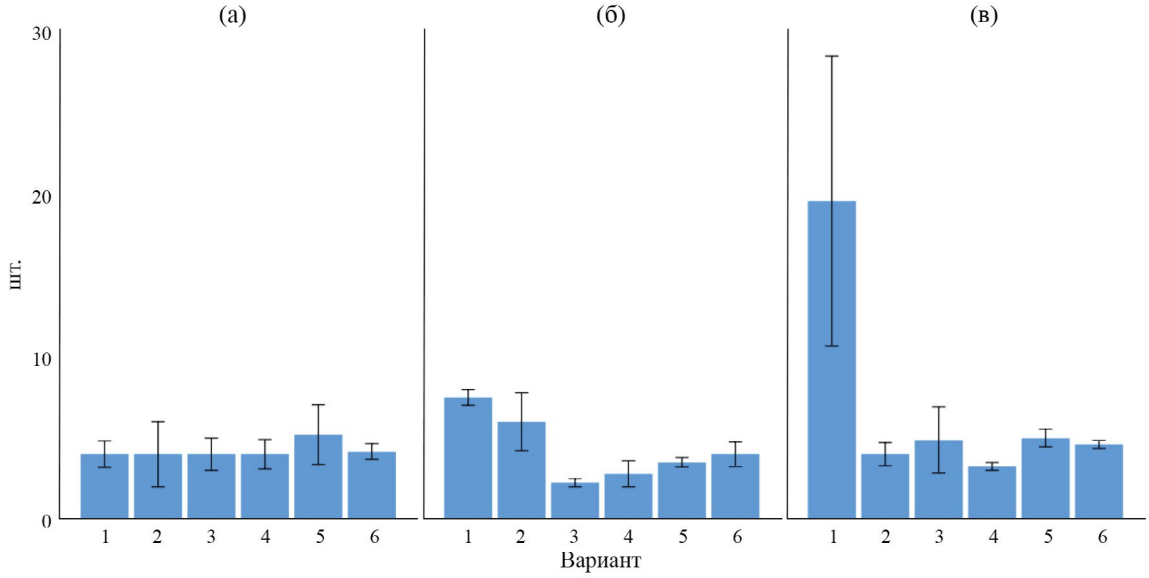

Рис. 3. Число полос с пустулами желтой ржавчины пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ (4, 5), 2022 г.: *1* — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — B. *subtilis* И-5 (а, б, в — повторности опыта).

числом пятен на Солнце в июле (r = 0.96). Наибольшее число достоверных коэффициентов корреляции выявлено между суммой температур в июле, УФ-индексом в июле и относительными изменениями в значениях морфометрических показателей продуктивности пшеницы при применении полифункционального комплекса: фаза растения (r = 0.98–0.99), площадь предфлагового листа (r = 0.99), длина колоса (r = 0.98–0.99). Однако его эффективность снижалась в отношении массы колоса с увеличением суммы температур в июле (r = –0.98) и УФ-индекса в июле (r = –0.95). Рост величины ГТК в августе определял увеличение числа зерен в колосе (r = 0.97) в указанном варианте опыта, но при этом приводил к снижению длины узловых корней (r = –0.97). Понижение суммы температур и УФ-индекса в мае влияло на рост вегетативной массы растений (r = –0.96), общей кустистости растений (r = –0.97) по сравнению с контролем при применении полифункционального комплекса, но приводило к снижению числа колосков в колосе (r = 0.96).

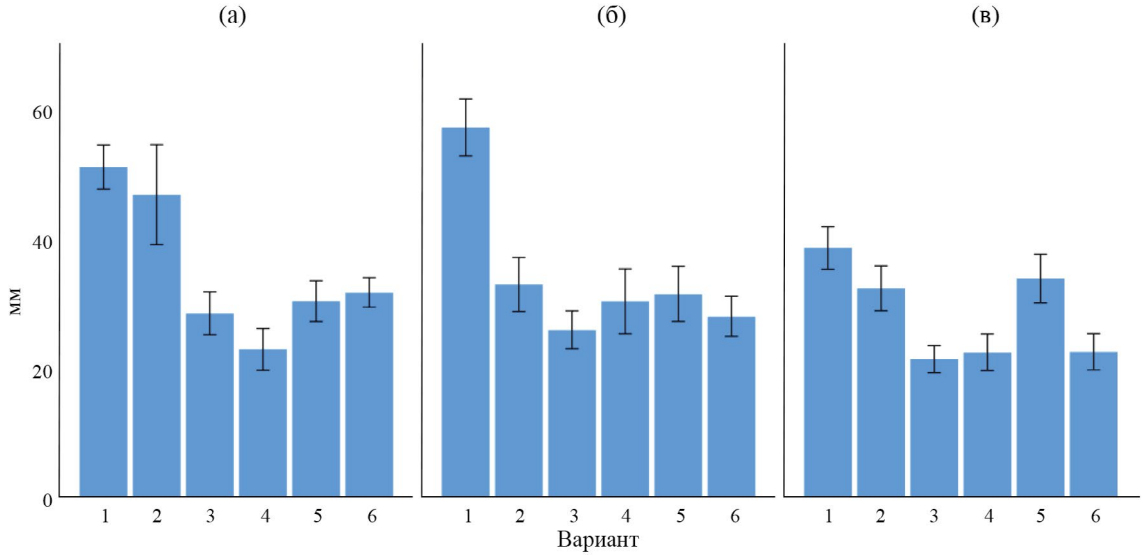

Рис. 4. Длина полосы с пустулами желтой ржавчины пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ (4, 5), 2022 г.: 1 — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — В. *subtilis* И-5 (а, б, в — повторности опыта).

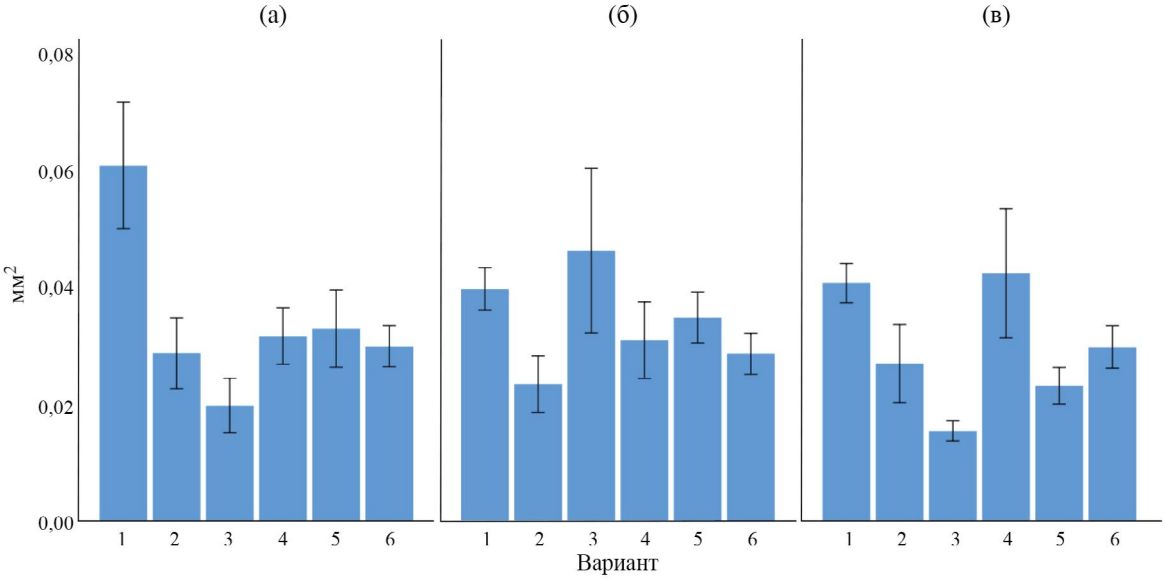

Рис. 5. Площадь пустулы желтой ржавчины пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 01% СХ (4, 5), 2022 г.: 1 — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — В. *subtilis* И-5 (а, б, в — повторности опыта).

На втором этапе исследований (2022 г.) осуществлен сравнительный анализ эффективности: полифункционального комплекса *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ, биопрепарата Витаплан, СП, бактериальных штаммов *B. subtilis* ВКМ; *B. subtilis* В-2604D, *B. subtilis* ВКМ В-2605D, *B. subtilis* И-5, полифункционального комплекса *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ. В 2022 г. во всех вариантах опыта с использованием микробиологических препаратов и полифункциональных комплексов отмечено существенное снижение интенсивности развития желтой ржавчины на посевах пшеницы (рис. 2). В среднем по трем повторностям было установлено, что наибольшей биологической эффективностью в отношении болезни отличались полифункциональный комплекс

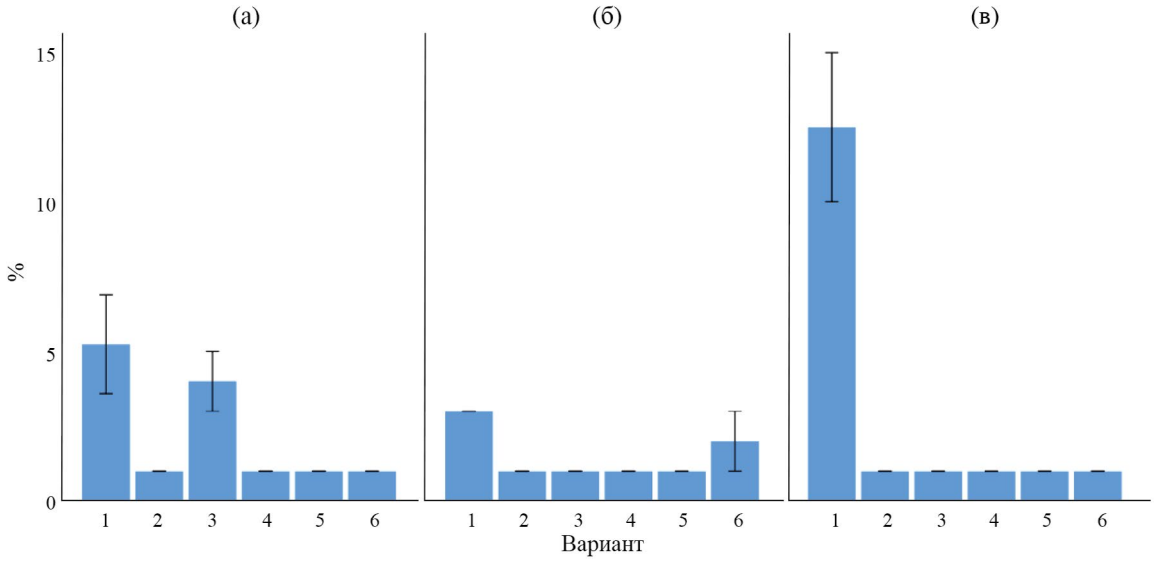

Рис. 6. Интенсивность развития мучнистой росы (%) пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ (4, 5), 2022 г: 1 — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — В. *subtilis* И-5 (а, б, в — повторности опыта).

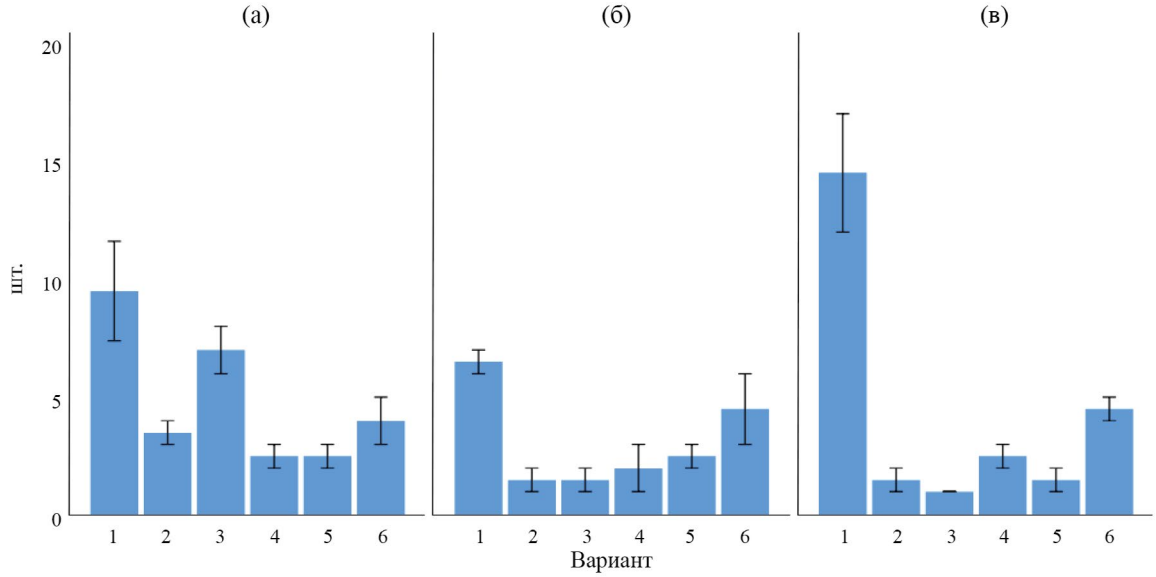

Рис. 7. Число пятен с налетом мучнистой росы (%) пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ (4, 5), 2022 г.: 1 — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — *B. subtilis* И-5 (а, б, в — повторности опыта).

B. subtilis ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ, а также бактериальные штаммы *B. subtilis* ВКМ B-2604D, *B. subtilis* ВКМ B-2605D и биопрепарат “Витаплан, СП”. В указанных вариантах опыта по сравнению с контролем развитие желтой ржавчины снижалось на 21–22% (биологическая эффективность **БЭ** = 72–73%). При использовании полифункционального комплекса *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ развитие болезни снизилось на 18.5% относительно контроля (БЭ 62.7%), а в варианте опыта с *B. subtilis* И-5 — на 18.8% (БЭ 63.7%).

Минимальное значение числа полос желтой ржавчины на флаговом листе, $N_{пж}$ = 3.31 ± 0.41 шт., было выявлено в варианте опыта *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D (рис. 3), что было на 76.2% меньше, чем в контроле ($N_{пж}$= 13.9 ± 2.53 шт.). При использовании полифункционального комплекса *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ число

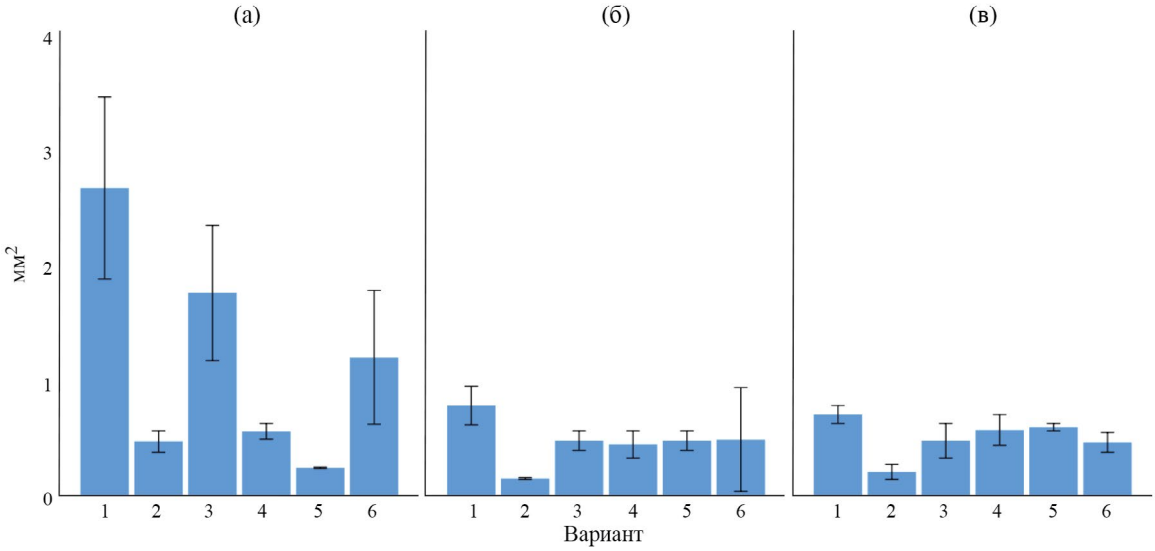

Рис. 8. Площадь пятна с налетом мучнистой росы (%) пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ (4, 5). 2022 г.: 1 — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — B. *subtilis* И-5 (а, б, в — повторности опыта).

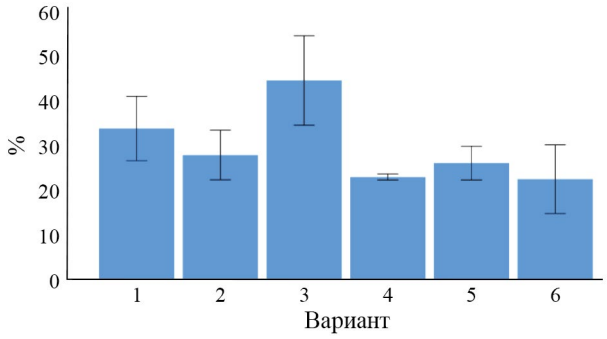

Рис. 9. Развитие корневой гнили (%) пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ (4, 5), 2022 г.: 1 — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — B. *subtilis* И-5.

полос с пустулами желтой ржавчины снизилось на 66.6% относительно контроля.

Наибольшее снижение длины полосы с пустулами желтой ржавчины было отмечено в варианте опыта Витаплан, СП (на 45.2%) и *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ (на 43.5%). При применении комплекса *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ величина показателя снизилась по сравнению с контролем на 26.5% (рис. 4).

После применения биопрепарата Витаплан, СП и бактериальных штаммов *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D отмечено наибольшее снижение значений площади пустулы желтой ржавчины (рис. 5). В данном варианте опыта изменение фитопатологического показателя составило 32–38%. В вариантах *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ – 12.8%, *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ – 21.0%.

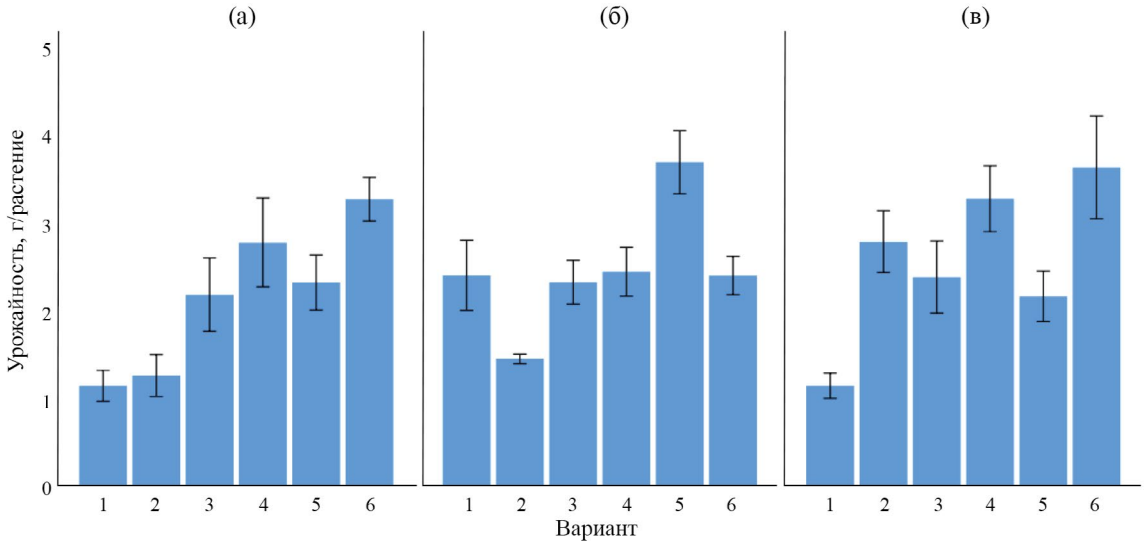

Рис. 10. Урожайность пшеницы (г/растение) при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ (4, 5), 2022 г.: 1 — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — В. *subtilis* И-5. Повторности опыта: а — первая, б — вторая, в — третья.

Определено существенно снижение развития мучнистой росы во всех вариантах опыта при применении бактериальных штаммов и полифункциональных комплексов (рис. 6). Биологическая эффективность полифункциональных комплексов *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ и *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ в отношении болезни составила 92,8%, а развитие болезни снизилось на 12.8%.

В наибольшей степени снизилось число пятен с налетом мучнистой росы – на 87–88%, а также их площадь — на 75–86.9% в вариантах опыта *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D, *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ, *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ (рис. 7 и 8).

Выявлена тенденция снижения интенсивности развития корневой гнили пшеницы в вариантах опыта: Витаплан, КЖ — на 5.9%; *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ — на 7.7%; *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ — на 10.8%; *B. subtilis* И-5 — на 11.3% (рис. 9).

Снижение поражаемости пшеницы болезнями при применении бактериальных штаммов *B. subtilis* и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ оказало существенное влияние на рост биологической Y_b (рис. 10) и потенциальной урожайности Y_w (рис. 11). В среднем по трем повторностям наибольший рост урожайности Y_b = 69–93% и Y_w = 86–92% по сравнению с контролем зарегистрирован в вариантах опыта с использованием полифункциональных комплексов: *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ, *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ, а также в варианте *B. subtilis* И-5. При использовании биопрепарата Витаплан, СП увеличение урожайности составило: Y_b = 42.7% и Y_w = 44.1%.

Особенности изменений морфометрических показателей продуктивности мягкой пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ приведены в табл. 1. В вариантах опыта с применением полифункциональных комплексов: *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ и *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ отмечен рост 33.3 и 38.1% показателей к контролю соответственно. Однако максимальное увеличение морфометрических показателей продуктивности (57.1%) отмечено в варианте опыта с *B. subtilis* И-5, показатель для Витаплан, СП — 28.6%; *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D — 42.9%. При этом варианты опытов по убыванию величины относительного роста показателей, характеризующих только структуру колоса, было *B. subtilis* И-5–55.6% < *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ = *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D — 44.4% < Витаплан, СП — 11.1%.

При применении полифункциональных комплексов выявлен максимальный рост значений следующих морфометрических показателей по сравнению с другими вариантами опыта: *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ — число первичных корней на 39.6%; число узловых корней на 54.7%; длина узловых корней на 21.8%; продуктивная кустистость на 57.3%; число колосков в колосе на 6.6%; *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ — масса зерен одного колоса на 18.8% с меньшим на 0.9% числом пустых колосков в колосе.

Таблица 1. Морфометрические показатели продуктивности мягкой пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* и полифункциональных комплексов с 0.1%-ным салицилатом хитозана

Варианты опыта	Фаза растения, балл	Высота растения, см	Число первичных корней, шт.	Длина первичных корней, мм	Число узловых корней, шт.	Длина узловых корней, мм	Продуктивная кустистость	Общая кустистость	Площадь флаг-листа, см^2
Контроль (вода)	69.2 ± 0.6	75.0 ± 1.9	5.2 ± 0.4	45.6 ± 3.0	13.6 ± 1.3	44.7 ± 2.6	1.7 ± 0.1	2.0 ± 0.2	3.4 ± 0.1
B. subtilis ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D	61.5* 1.4	75.9 ± 4.1	6.1 ± 0.5	66.1 ± 4.1	16.0 ± 1.3	38.5 ± 2.6	1.8 ± 0.2	2.9** ± 0.3	6.7** ± 0.8
Витаплан. СП	67.5* ± 0.6	74.9 ± 2.0	5.9 ± 0.3	52.9 ± 3.6	17.2** ± 1.2	46.9 ± 3.2	2.3** ± 0.2	3.1** ± 0.2	3.6 ± 0.1
B. subtilis ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ	67.9 ± 0.7	72.5 ± 2.2	5.9 ± 0.4	59.7** ± 3.9	15.8 ± 1.1	44.7 ± 3.3	2.3** ± 0.3	3.5** ± 0.3	3.5 ± 0.2
B. subtilis И-5 + 0.1% СХ	63.4* ± 1.0	71.4 ± 2.4	7.2** ± 0.3	59.5** ± 3.4	21.1** ± 1.8	54.5** ± 3.6	2.7** ± 0.2	3.6** ± 0.3	3.3 ± 0.2
B. subtilis И-5	65.9* ± 1.0	75.3 ± 2.8	6.2 ± 0.5	59.3** ± 4.7	15.9 ± 1.3	49.2 ± 3.1	2.6** ± 0.2	3.2** ± 0.3	3.7 ± 0.2

Продолжение табл. 1

Варианты опыта	Площадь предфлаг-листа, см^2	Масса корней, г	Масса вегета-тивной части, г	Длина колоса, мм	Число колос-ков в колосе	Масса колоса, г	Масса зе-рен одного колоса, г	Масса 1000 зерен, г	Число зерен в колосе	Число зерен в колоске колоса	Вес зерен в колоске колоса, г	Пустые колоски в колосе,%
Контроль (вода)	5.2 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	70.9 ± 1.8	15.0 ± 0.2	0.5 ± 0.0	1.1 ± 0.1	32.4 ± 0.9	32.7 ± 1.8	2.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	1.4 ± 0.2
B. subtilis ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D	8.1** ± 0.7	1.2** ± 0.1	2.7** ± 0.2	78.5** ± 1.6	15.8** ± 0.3	0.7** ± 0.0	1.2 ± 0.1	36.5** ± 1.0	32.3 ± 2.4	2.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	1.5 ± 0.3
Витаплан. СП	5.5 ± 0.2	1.2** ± 0.1	1.6** ± 0.1	74.7 ± 1.6	15.7** ± 0.2	0.6 ± 0.0	1.0 ± 0.1	32.3 ± 1.1	31.0 ± 1.4	2.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.2
B. subtilis ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ	5.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.6** ± 0.1	73.4 ± 1.6	15.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.2** ± 0.1	36.0** ± 1.0	34.4 ± 1.3	2.3 ± 0.1	0.1** ± 0.0	0.9* ± 0.2
B. subtilis И-5 + 0.1% СХ	4.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.5** ± 0.1	72.6 ± 1.4	16.0** ± 0.2	0.4 ± 0.0	1.0 ± 0.1	33.8 ± 1.2	29.1 ± 1.2	2.1* ± 0.1	0.1* ± 0.0	1.4 ± 0.3
B. subtilis И-5	6.1** ± 0.4	1.1** ± 0.1	1.9** ± 0.1	76.6** ± 1.4	15.6 ± 0.2	0.7** ± 0.0	1.2** ± 0.1	36.4** ± 0.8	33.3 ± 1.1	2.5** ± 0.1	0.1** ± 0.0	1.2 ± 0.3

*Различия с контролем существенно меньше при $P < 0.05$. ** Различия с контролем существенно больше при $P < 0.05$.

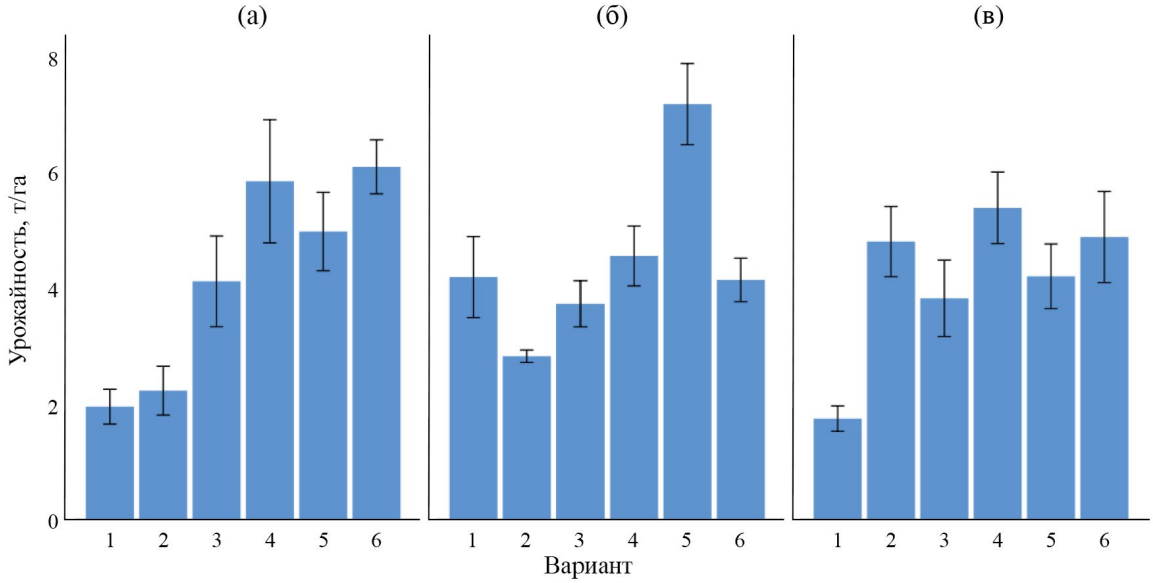

Рис. 11. Урожайность пшеницы (т/га) при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* (2, 6) и полифункциональных комплексов с 0.1% СХ (4, 5), 2022 г.: 1 — контроль (вода); 2 — *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D; 3 — Витаплан, СП; 4 — *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ; 5 — *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ; 6 — *B. subtilis* И-5 (а, б, в — повторности опыта).

Определено существенное увеличение массы зерен в колоске колоса на 15.1% при применении полифункционального комплекса *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ, а также в варианте опыта со штаммом *B. subtilis* И-5 — на 15.5%. Снижение показателя на 14.2% выявлено при применении полифункционального комплекса *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ. Существенный рост числа зерен в колоске колоса на 10.8% отмечен в варианте *B. subtilis* И-5, тенденция роста на 3.8% — в варианте *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ.

Результаты морфометрической и рентгенографической оценки полученных семян пшеницы при обработке растений бактериальными штаммами и полифункциональными комплексами представлены в табл. 2. После обработки растений бактериальными штаммами и полифункциональными комплексами на основе 0.1%-ного СХ достоверно увеличивался средний размер получаемых семян, особенно варианте *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ, а также округлость зерен — в вариантах *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D и *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ. Удлиненность зерен, напротив, снижалась достоверно лишь в варианте *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ. Средняя яркость рентген-проекции семян достоверно увеличивалась в варианте *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ и снижалась в варианте *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D и Витаплан, СП.

По данным [31], параметры прорастания тесно связаны с морфометрическими параметрами семян, которые могут определяться и с помощью

Таблица 2. Результаты морфометрической и рентгенографической оценки семян пшеницы при обработке растений бактериальными штаммами и полифункциональными комплексами

Вариант опыта	Показатель			
	Средний размер. мм	Средняя яркость рентген-проекции, ед. яркости	Округлость, отн. ед.	Удлиненность, отн. ед.
Контроль (вода)	4.97 ± 0.042	135.4 ± 0.61	0.508 ± 0.005	1.990 ± 0.0188
B. subtilis ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D	4.91 ± 0.043	133.7 ± 0.62*	0.520 ± 0.006*	1.957 ± 0.0196
Витаплан СП	5.16 ± 0.076*	132.1 ± 0.84*	0.507 ± 0.008	2.007 ± 0.0288
B. subtilis ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ	5.04 ± 0.040	134.7 ± 0.57	0.510 ± 0.005	1.978 ± 0.0188
B. subtilis И-5 + 0.1% СХ	5.07 ± 0.038*	136.8 ± 0.58*	0.520 ± 0.005*	1.951 ± 0.0186*
B. subtilis И-5	4.99 ± 0.083	136.4 ± 1.11	0.510 ± 0.008	1.980 ± 0.0426

* Различия существенны при $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

рентгенографического анализа: большие семена прорастали раньше и показали лучшее прорастание по сравнению с мелкими в лабораторных условиях.

Согласно работе [32], оптические характеристики рентгенограмм важны для обеспечения качества семян. По данным [33], параметр относительной оптической плотности позволяет делать выводы относительно плотности внутренних тканей семян и, следовательно, относительно физиологического качества семян. При формировании зерна в неблагоприятных условиях увеличивается количество внешних оболочек и снижается объём эндосперма. С увеличением округлости зерен их посевные качества ухудшались, а с увеличением удлиненности зерен — наоборот улучшались [34]. Можно предположить, что удлиненные зерна имеют более полноценно сформированный зародыш.

Таким образом, следует отметить, что в последние годы усилия многих исследователей направлены на разработку методов повышения эффективности биопрепаратов. Как показали результаты настоящей работы, этой цели можно достичь путем повышения индуцирующей активности штамма-продуцента путем включения в состав препаративной формы природных или синтетических активаторов болезнеустойчивости. Это направление исследований активно развивается в лаборатории микробиологической защиты ФГБНУ ВИЗР. Высокий защитный эффект таких комплексных препаративных форм обусловлен сочетанием антагонистических свойств штамма микроорганизма со способностью индуктора устойчивости совместно с активными микробными метаболитами активизировать механизмы естественной устойчивости растений к фитопатогенам.

В России для защиты сельскохозяйственных культур от грибных и бактериальных болезней широко применяется биопрепарат Витаплан СП, разработанный в ВИЗР на основе высокоактивных штаммов *B. subtilis* (ВКМ B-2604D и ВКМ B-2605D) [35–37]. Для усиления его биологической эффективности в препаративную форму в качестве индуктора устойчивости был включен СХ. В проведенных ранее исследованиях была выявлена высокая активность СХ, индуцирующего устойчивость к бурой ржавчине и темно-бурой пятнистости пшеницы [1]. Обработка им (0.1%) вегетирующих растений пшеницы уменьшала степень поражения растений корневой гнилью на 79.0%, желтой ржавчиной — на 29.1% и полностью подавляла развитие мучнистой росы в период вегетации растений [38]. Полученные результаты подтвердили перспективность использования разработанных новых полифункциональных препаративных форм для расширения ассортимента микробиологических средств защиты растений.

***

Бактериальные штаммы и полифункциональные комплексы на их основе: *B. subtilis* И-5, *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605, Витаплан, СП; *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ, *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ существенно снижали интенсивность развития болезней, увеличивали урожайность и улучшали морфометрические показатели пшеницы. Однако на примере полифункционального комплекса *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ показано, что на эффективность защитных и стимулирующих обработок пшеницы оказывали влияние природно-климатические факторы вегетационных периодов, а также фитосанитарное состояние посевов. Добавление 0.1% СХ к бактериальным штаммам *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D и *B. subtilis* И-5 повышало биологическую эффективность таких комплексов в отношении желтой ржавчины пшеницы и мучнистой росы. Снижение поражаемости растений возбудителями болезней при применении бактериальных штаммов и полифункциональных комплексов влияло на урожайность пшеницы и ее морфометрические показатели. Наибольший рост урожайности пшеницы зарегистрирован в вариантах опыта *B. subtilis* ВКМ B-2604D + ВКМ B-2605D + 0.1% СХ, *B. subtilis* И-5 + 0.1% СХ, а также в варианте *B. subtilis* И-5. Перспективой дальнейших исследований в области влияния стимулирующих и защитных обработок пшеницы на показатели скрытой неоднородности и дефектности семян является выявление факторов, прежде всего связанных с их энзимомикозным истощением. Актуальна оценка посевных качеств полученных семян (стандартный тест на энергию прорастания и всхожесть, измерение длины первичных корней и проростка), а также сопоставление этих показателей с полученными в данной работе морфометрическими и рентгенографическими характеристиками зерен. Результаты работы могут быть использованы для разработки ресурсосберегающей технологии возделывания пшеницы и оптимизации фитосанитарного состояния агроэкосистем.

Работа была выполнена в рамках государственного задания в соответствии с тематическим планом ВИР по проекту FGEM-2022–0009 “Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института (учреждения, организации). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Попова Э.В., Коваленко Н. М., Сокорнова С. В., Тютерев С. Л.* и др. // *Прикл.* биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 5. С. 540–545. https://doi.org/10.1134/S055510991805015X
2. *Попова Э. В., Домнина Н. С., Сокорнова С. В., Коваленко Н. М., Тютерев С. Л.* // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56. № 1. С. 158–170. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.1.158rus
3. *Варламов В. П., Албулов А. И., Фролова М. А., Гринь А. В., Мысякина И. С.* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 4. С. 529–532. https://doi.org/ 10.31163/2618–964X-2019-2-4-529-532
4. *Карпова Н. В., Шагдарова Б. Ц., Лялина Т. С., Ильина А. В., Терешина В. М., Варламов В. П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 386–395. https://doi.org/10.1134/S0555109919040068
5. *Новикова И.И., Попова Э. В., Краснобаева И. Л., Коваленко Н. М.* // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56. № . 3. С. 511–522. https://doi.org/*10.15389/agrobiology.2021.3.511rus*
6. *Novikova I., Minin V., Titova J., Krasnobaeva I., Zaharov A., Perekopsky A.* // Agronomy Research. 2021. V. 19. № 3. P. 1617–1626. https://doi.org/10.15159/AR.21.135
7. *Павлюшин В.А., Тютерев С. Л., Попова Э. В., Новикова И. И., Быкова Г. А., Домнина Н. С.* // Биотехнология. 2010. № 4. С. 69–80.
8. *Зимина Ю.А., Срослова Г. А., Постнова М. В.* // Вестник ВолГУ. Серия 11. Естественные науки. Природные системы и ресурсы. 2018. Т. 8. № 3. https://doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2018.3.3
9. *Минаков Д.В., Верещагин А. Л., Мороженко Ю. В., Базарнова Н. Г.* // Химия растительного сырья. 2019. № 1. С. 251–257. https://doi.org/10.14258/jcprm.2019014368
10. *Xie D., Cai X., Yang C., Xie L., Qin G., Zhang M. et al.* // Pest Management Science. 2021. V. 77. P. 4375–4382. https://doi.org/10.1002/ps.6471
11. *Stein T.* // Mol. Microbiol. 2005. V. 56. P. 845–857. https://doi.org/10.1111/j.1365–2958.2005.04587.x
12. *Moyne A.-L., Cleveland T. E., Tuzun S.* // FEMS Microbiol. Letters. 2004. V. 234. P. 43–49.
13. *Zhang D., Guo X., Wang Y., Gao T., Zhu B.* // Let. Appl. Microbiol. 2017. V. 65. P. 512–519. doi.org/10.1111/lam.12809
14. *Guo Q., Dong W., Li S., Lu X., Wang P., Zhang X., Wang Y., Ma P.* // Microbiological Research. 2014. V. 169. P. 533–540.
15. *Сидорова Т.М., Асатурова А. М., Хомяк А. И.* // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 1. С. 29–37. https://doi.org/10.1111/j.1365–2958.2005.04587.x
16. *Черепанова Е.А., Благова Д. К., Бурханова Г. Ф., Сарварова Е. С., Максимов И. В.* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 3. С. 339–346. https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-339-346
17. *Zhang X., Chen X., Qiao X., Fan X., Huo X., Zhang D.* // Journal of Separation Science. 2021. V. 44. P. 931–940.
18. *Павлюшин В.А., Новикова И. И., Бойкова И. В.* // Защита и карантин растений. 2022. № 4. С. 10–18.
19. *van Duijn B., Priyatkin N. S., Bruggink H., Gomes F., Boelt B., Gorian F., Martinez M. A.* // Informativo ABRATE. 2017. V. 27. № 2. P. 18–22.
20. *Прияткин Н.С., Архипов М. В., Щукина П. А., Мирская Г. В., Чесноков Ю. В.* // Сельскохозяйственная биология. 2022. Т. 57. № 5. С. 911–920. https://doi.org/ 10.15389/agrobiology.2022.5.911rus
21. Dell'Aquila A. // Biometry Crop Sci. 2006. V. 1. № 1. P. 20–31.
22. *Boelt B., Shrestha S., Salimi Z., Jørgensen J. R., Nicolaisen M., Carstensen J. M.* // Seed Science Research. 2018. V. 28. № 3. P. 222–228. https://doi.org/10.1017/S09602585180002353
23. *Jalink H., Frandas A., van der Schoor R., Bino J. B.* // Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.). 1998. V. 55. P. 88–93. https://doi.org/10.1590/S0103–90161998000500016
24. *Архипов М.В., Потрахов М. Н.* Микрофокусная рентгенография растений. СПб: Технолит, 2008. 194 с.
25. *Gomes-Junior F.G., Yagushi J. T., Belini U. L., Cicero S. M., Tomazello-Filho M.* // Seed Science and Technology. 2012. V. 40. № 1. P. 102–107. https://doi.org/10.15258/sst.2012.40.1.11
26. *Del Nobile M. A., Laverse J., Lampignano V., Cafarelli B., Spada A.* Applications of Tomography in Food Inspection. In: Industrial tomography. Systems and applications / Ed. Mi Wang. Woodhead Publishing. Elsevier Ltd., 2015. P. 693–710. https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-118-4.00025-3
27. *Foucat L., Chavagnat A., Renou J.-P.* // Scientia Horticulturae, 1993. V. 55. P. 323–331.
28. *Martinez M.A., Priyatkin N. S., van Duijn B.* // Seed Testing International. 2018. V. 156. P. 53–56.
29. *Колесников Л.Е., Попова Э. В., Новикова И. И., Прияткин Н. С., Архипов М. В., Колесникова Ю. Р. и др.* // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. С. 1024–1040. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.1024rus
30. *Kolesnikov L.E., Novikova I. I., Popova E. V., Priyatkin N. C., Zuev E. V., Kolesnikova Y. R., Solodyannikov M. D.* // Agronomy Research. 2020. V. 18. № 4. P. 2436–2448. https://doi.org/10.15159/AR.20.206
31. *Cicek E., Tilki F.* // J. Biol. Sci. 2007. V. 7. P. 438–441.
32. *Huang M., Wang Q. G., Zhu Q. B., Qin J. W., Huang G.* // Seed Science and Technology. 2015. V. 43. № 3. P. 337–366.
33. *Abud H.F., Cicero S. M., Gomes Junior F. G.* // Acta Scientiarum: Agronomy. 2018. V. 40. № 1. P. 1–9. https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.34950
34. *Рутковская Т.С., Архипов М. В., Пасынкова Е. Н., Прияткин Н. С., Конончук П. Ю., Кочерина Н. В., Симон К. В.* // Агрофизика. 2022. № 1. С. 42–48. https:// doi.org/10.25695/AGRPH.2022.01.07

35. *Новикова И.И., Бойкова И. В., Морозов Д. О.* // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2011. № 42. С. 147–154.

36. *Новикова И.И., Бойкова И. В., Павлюшин В. А., Зейрук В. Н.* и др. // Вестник защиты растений. 2013. № 4. С. 12–21

37. *Novikova I.I., Titova Yu.A., Boykova I. V., Zeyruk V. N., Krasnobaeva I. L.* // Bulletin of Plant Protection. 2017. № 3. P. 16–23.

38. *Колесников Л.Е., Попова Э. В., Новикова И. И., Колесникова Ю. Р.* и др. // *Прикл.* биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 3. С. 294–301. https://doi.org/10.31857/S0555109922030072

The Biological Efficiency of Multifunctional Complexes Based on *Bacillus subtilis* Strains and Chitosan Salicylate in Wheat Cultivation

I. I. Novikova[b], L. E. Kolesnikov[a, *], E. V. Popova[b], B. A. Hassan[c], N. S. Priyatkin[d], D. Yu. Radishevskiy[a], I. L. Krasnobaeva[d], L. A. Higerovich[b], and Yu. R. Kolesnikova[e]

[a]*Saint-Petersburg State Agrarian University, St. Petersburg, Pushkin, 196601 Russia*
[b]*All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, 196608 Russia*
[c]*Ministry of Agriculture, Agricultural Research Office, Abo-Ghraib, St. Al-Zaytun, H. 10081, Baghdad, Iraq*
[d]*Agrophysical Research Institute (ARI), St. Petersburg, 195220*
[e]*N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, 190031 Russia*
**e-mail: kleon9@yandex.ru*

The influence of multifunctional complexes capable of causing a growth-stimulating effect on plants and inhibiting the development of a wide range of diseases on the Leningradka 6 spring soft wheat cultivar (k-64900) was investigated. In the research, it was found that the application of multifunctional complexes based on the *Bacillus subtilis* bacterial strains and 0.1% chitosan salicylate in wheat cultivation led to a significant decrease in the incidence of plant diseases: yellow and brown rust, powdery mildew, root rot and caused an increase in morphometric productivity indicators. This tendency was associated with a significant influence of multifunctional complexes on the increase in the number of primary and nodal roots; the length of nodal roots; productive bushiness; the number of spikelets per spike; the grains weight per spike. However, the effectiveness of protective and stimulating wheat treatments depended on the complex of natural and climatic factors of wheat vegetation seasons.

Keywords: biopreparations, chitosan salicylate, bacterial strains, *Bacillus subtilis*, soft wheat, productivity elements, wheat diseases